

**Maus Herpesvirus 68 (MHV-68) Infektion – Modell für die Epstein-Barr Virus-
Infektion des Menschen**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Matthias Engler

aus

Frankfurt am Main

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Klaus Ritter

Herr Privatdozent
Dr. med. Martin Georg Häusler

Tag der mündlichen Prüfung: 4. November 2008

***Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.***

Für
Helena und Ronja

In Gedenken an
Steffi

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

Maus Herpesvirus 68 (MHV-68) Infektion – Modell für die EBV-	
 Infektion des Menschen	1
 Das Maus Herpesvirus 68	2
Zuordnung des Virus und dessen Struktur	2
Infektionsverlauf bei Mäusen	3
Immunreaktion auf MHV-68 Infektionen	4
Die latente Persistenz von MHV-68	5
Bekannte Modelle einer ZNS-Infektion mit MHV-68	5
 Ziel dieser Arbeit	6

2 Material

2.1 Tiere und Organe	7
2.2 Gewebeschnitte	7
2.3 Zelllinien	7
2.4 Bakterien	7
2.5 Vektoren	8
2.6 Oligonukleotide	9
2.7 Antikörper	10
2.7.1 Primärantikörper	10
2.7.2 Sekundärantikörper	10
2.7.3 Tertiärantikörper	10
2.8 Virus	10
2.9 Spezielle Testsysteme	10
2.10 Chemikalien	11
2.11 Enzyme	11
2.12 Geräte	12
2.13 Zellkulturmedien	12
2.13.1 Medium für BHK-21 Zellen	12

2.13.2 Medium für primäre Mauslymphozyten	12
2.13.3 Medium für etablierte MHV-68 positive Lymphozytenkultur	13
2.14 Verwendete Lösungen und Puffer	13
2.15 Materialien zur Zellkultur	14

3 Methoden

3.1 Organentnahme und Aufbewahrung	14
3.2 Kultivierung von BHK-21 Zellen	14
3.3 Isolieren von Lymphozyten aus MHV-68-infizierten Mäusen	14
3.4 Archivieren adhärenter Zellen	15
3.5 Archivieren von Zellen aus Suspensionskultur	15
3.6 Isolieren von DNA	16
3.6.1 Gewebe	16
3.6.2 Blut und Zellsuspensionen	16
3.7 Isolieren von RNA	16
3.8 Spaltung mit DNase	16
3.9 C-DNA Synthese	17
3.10 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	18
3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
3.11.1 Konventionelle PCR	18
3.11.2 Bedingungen für spezifische PCR-Reaktionen	19
3.11.3 Agarosegelelektrophorese	20
3.12 Real-Time-PCR	21
3.12.1 Nachweis der Amplifikate mittels <i>SYBR Green I</i>	22
3.12.2 Bedingungen für die Real-Time-PCR	22
3.13 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)	24
3.13.1 Immunfluoreszenztest für Zellen	24
3.13.2 Immunfluoreszenztest an Gewebeschnitten	25
3.14 Vermehrung von MHV-68	26
3.15 Virustitration	26
3.16 Anzucht von MHV-68 aus Gewebeproben	27
3.17 Herstellung von Größenstandards für die Real-Time-PCR	27
3.17.1 Plasmidgenerierung und Transformation	28

3.17.2 Selektion der transformierten Bakterien	28
3.17.3 DNA-Minipräparation	28
3.17.4 Spaltung mit Restriktionsendonucleasen	28
3.17.5 DNA-Maxipräparation	29
3.18 Auswertung der Daten	29

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung neuer erforderlicher Methoden	30
4.1.1 Quantifizierung der infektiösen Virionen mittels Virustitration	30
4.1.2 Qualitativer Nachweis viraler RNA und quantitativer Nachweis viraler DNA	30
4.1.2.1 RNA-Nachweismethoden	30
4.1.2.2 Etablierung einer quantitativen Real-Time PCR zum Nachweis viraler DNA	30
4.1.3 Methode zum Nachweis von Virusantigen im Gewebe	32
4.1.4 Etablierung einer durch MHV-68-Infektion immortalisierten B-Zelllinie	34
4.2 Morbidität und Mortalität waren vom Alter bei Infektion abhängig	35
4.3 Nachweis von MHV-68 DNA in verschiedenen Organen	37
4.4 Transkriptionsaktivität und Infektiosität von MHV-68	38
4.4.1 Nachweis auf RNA-Ebene	38
4.4.2 Direkter Nachweis von Virionen mittels des zytopathischen Effekts	40
4.5 Verlauf der Virusmengen	40
4.6 Nachweis von Virusantigen in peripheren Geweben	41
4.7 ZNS-Infektion nach nasaler Inokulation	43
4.7.1 Nachweis von Virus-DNA im ZNS	43
4.7.2 Nachweis von Virusantigen im ZNS	44
4.7.3 Vergleich virologischer und immunhistochemischer Befunde	46

5 Diskussion

5.1 Die peripheren Organe im Verlauf der Infektion	49
5.2 Natürliche Infektion des ZNS	50

5.3 Zeitlicher Verlauf von Infektion und Immunabwehr	51
5.4 Ort der Infektion und Replikation	52
5.5 Ausblick	53
6 Zusammenfassung	54
7 Literaturverzeichnis	55
A Anhang	59
Abkürzungsverzeichnis	59
Abbildungsverzeichnis	60
Danksagung	62
Erklärung zur Datenaufbewahrung	63
Lebenslauf	64

1. Einleitung

Maus Herpesvirus 68 Infektion als Modell für die Epstein-Barr-Virus-Infektion des Menschen

Das Epstein-Barr Virus (EBV), ein Gammaherpesvirus, verursacht das Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose. Das Virus persistiert lebenslang latent in B-Zellen und kann, insbesondere bei immunkompromittierten Patienten, zu lymphoproliferativen Erkrankungen führen. Wichtige Komplikationen der akuten oder reaktivierten EBV-Infektion sind Meningoenzephalitis, Periventrikulitis, Hydrozephalus und Temporallappenepilepsien. Bis zu 20 Prozent entzündlicher Schäden des ZNS bei Kindern könnten durch das EBV verursacht sein (Häusler et al. 2002). Es gab bisher kein Tiermodell für die EBV-Infektion. Mit der Entdeckung des murinen Herpesvirus 68 (MHV-68) (Blaskovic et al. 1980) stand dann ein tierisches Gammaherpesvirus zur Verfügung, dessen klinische Manifestation der EBV-Infektion des Menschen sehr ähnlich ist.

MHV-68 wurde, wie im Folgenden beschrieben, den Gammaherpesviren zugeordnet. Der Krankheitsverlauf ähnelt der durch EBV verursachten Mononukleose. Die entscheidende Frage war, ob das Virus auch neuropathologische Potenz besitzt. Sowohl EBV als auch MHV-68 führen zu transienten, lytischen Infektionen von Epithelzellen, wobei EBV Zellen des Oropharynx befällt, während MHV-68 vorwiegend in Alveolarepithelzellen repliziert wird. Gleichzeitig sind B-Lymphozyten, in denen eine latente Infektion etabliert wird. Beide Wirte reagieren mit Proliferation von T- und B-Zellen. Diese polyklonale Lymphozytenaktivierung führt dabei zu einer Vermehrung der mit Virus infizierten B-Zellen. Die Virusinfektion induziert eine polyklonale B-Zellaktivierung, die mit der Produktion von Antikörpern vielfältiger Spezifität verbunden ist.

Die latent infizierten Lymphozyten bleiben lebenslang in den Wirtsorganismen und können bei Immunsuppression zu einer Reaktivierung der Infektion oder zu Malignomen führen, wie z.B. Burkitt-Lymphom oder Nasopharynxkarzinom bei EBV, verschiedene Lymphome bei MHV-68.

Da nur Menschen und andere Primaten Wirte des EBV sind, waren Untersuchungen zur Pathogenität auf klinische Fälle oder in-vitro-Untersuchungen beschränkt. So

konnten viele Fragen zum Infektionsverlauf nicht beantwortet werden. Die große Ähnlichkeit in Genomaufbau und Pathogenese von EBV und MHV-68 machen es möglich, die MHV-68-Infektion der Maus als Modell für die EBV-Infektion des Menschen mit Schwerpunkt auf neurologischen Komplikationen zu entwickeln.

Das Maus Herpesvirus 68

Zuordnung des Virus und dessen Struktur

Das murine Herpesvirus 68 wurde 1980 aus freilebenden Rötelmäusen (*Myodes glareolus*) nach Passage in Hirngewebe neugeborener Mäuse isoliert (Blaskovic et al. 1980).

Der Neurotropismus und die elektronenmikroskopisch dargestellte Virusstruktur deuteten auf ein alpha-Herpesvirus hin. Nach der Genomanalyse wurde das Virus den Gammaherpesviren zugeordnet (Efsthathiou et al. 1990).

MHV-68 und verwandte (Gamma)herpesviren sind unter wildlebenden Mäusen weit verbreitet (Nash et al. 2001; Blasdel et al. 2003), ähnlich wie EBV beim Menschen.

MHV-68 kann in vitro in verschiedenen Epithel- oder Fibroblastzelllinien zytopathische Effekte verursachen. Gut geeignet für die Vermehrung des Virus sind BHK-21 Zellen.

In bestimmten Zelllinien kann auch eine latente Infektion etabliert werden, z.B. in NS0, einer Mausmyelomzelllinie (Sunil-Chandra et al. 1993).

Das Genom von MHV-68 besteht aus einer doppelsträngigen DNA von 118 kbp Länge. Es enthält 73 offene Leseraster, von denen die meisten Homologien zu anderen Gammaherpesviren aufweisen.

Es gibt einige virusspezifische Abschnitte. Dazu gehören die Gene M 1-4 und 8 Abschnitte, die für virale tRNA kodieren (Nash et al. 2001, Bowden et al. 1997).

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene sind mit ihren Funktion und den dazugehörigen homologen EBV-Genen in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Funktion einiger MHV-68-Gene und ihrer Homologe bei EBV

Gen:	Funktion:	Homologie zu EBV:
M 2	in der Latenz exprimiert,	-----
M 3	Chemokin bindendes Protein	-----
ORF 6	Einzelstrang-DNA bindendes Protein	BALF 2
M 7	Glycoprotein 150	-----
ORF 25	Capsid-Protein	BcLF 1
ORF 50	Gen 50, Rta	BRLF 1
ORF 57	Immediate-early protein	BMLF 1
ORF 59	DNA replication protein	BMRF 1

Bisher ist kein MHV-68 kodiertes Gen bekannt, das ausschließlich in der Latenz exprimiert wird. Es gibt aber einige Gene, deren Transkripte auch nach Abschluß der lytischen Phase nachweisbar sind. Dazu gehören die Gene M 2, M 3, M 8, M9 und die ORF's 73,74, sowie die 8 viralen tRNA's. Eine fortwährende Expression dieser Gene wird bei gleichzeitig abnehmender Expression der meisten anderen Gene als Zeichen einer latenten Infektion gewertet (Virgin et al. 1997; Virgin et al. 1999; Simas et al. 1999; Rochford et al. 2001; Husain et al. 1999). Alle bisher untersuchten Gene werden während der Replikationsphase transkribiert. Die Gene M 1-4 scheinen eine wesentliche Rolle für die Pathogenität des Virus zu spielen.

Infektionsverlauf bei Mäusen

MHV-68 wird vermutlich über den Nasopharynx aufgenommen. Die initiale Replikation verläuft in der Lunge als lytische Infektion mit den Zeichen einer Bronchiolitis. Zielzellen sind Alveolarepithelzellen. Es wurden aber auch MHV-68 positive mononukleäre Zellen in der Lunge gefunden. Es folgt die Virämie wobei das Virus in verschiedene Organe wie Leber, Niere, Herz, Thymus, Blut und Milz gelangt (Rajcani et al. 1985; Sunil-Chandra et al. 1992; Nash et al. 2001).

Ein Befall des Zentralnervensystems wurde bisher nur an Typ I Interferon-Rezeptor-negativen Mäusen oder nach direkter intrazerebraler Inokulation beobachtet (Terry et al. 2000).

Klinische Zeichen dieser Infektion zeigen sich 7-9 Tage nach Inokulation. Die Tiere sind abgeschlagen, das Fell ist glanzlos und struppig. Normalerweise erholen sich

die Tiere nach 2-3 Tagen. Das Versterben der Tiere ist selten und hängt von der initialen Virusdosis ab (Sunil-Chandra et al. 1992).

Nach oraler oder intragastraler Inokulation übersteht MHV-68 auch eine Magenpassage und führt zu einer lytischen Infektion von Darmepithelzellen. Auch hier folgt eine latente Infektion von B-Lymphozyten. In der Lunge lassen sich Virionen nicht nachweisen. Untersuchungen an wild lebenden Mäusen zeigen die Lunge als Hauptort der Viruspersistenz. Der Respirationstrakt scheint der wichtigste Eintrittsort für das Virus zu sein (Blasdell et al. 2003; Peacock et al. 2000).

Immunreaktion auf MHV-68 Infektionen

Interferon α und β besitzen eine antivirale Wirkung und haben damit eine wichtige Funktion bei der Abwehr und Überwindung von akuten und chronischen Virusinfektionen. Interferonrezeptor-negative Mäuse zeigen eine schwere Beteiligung der Lunge und eine rasche Ausbreitung des MHV-68. Die Infektion mit sonst nicht tödlichen Dosen (10^5 pfu) führt bei diesen Tieren in 80-90 Prozent zum Tod (Dutia et al. 1999c, Nash et al. 2001).

CD 4^+ T-Zellen stimulieren die spezifische B-Zellantwort. Dabei beschleunigen sie auch die Vermehrung der MHV-68 positiven B-Zellen. Die Produktion spezifischer Antikörper hängt ebenso von den MHV-68-positiven B-Zellen ab. Interessanterweise entstehen durch polyklonale B-Zellstimulation wesentlich mehr Antikörper, die kein erregerspezifisches Epitop aufweisen, als solche, die sich direkt gegen MHV-68 richten.

Wenige Tage nach der Infektion werden in Milz und Lymphknoten IgM-Antikörper gebildet, um nach etwa einer Woche von IgG abgelöst zu werden, vor allem IgG₂ a/b. 12 Wochen nach Infektion ist in diesen Organen kaum noch Immunglobulinbildung nachzuweisen. Diese Aufgabe übernehmen B-Zellen im Knochenmark zunehmend ab der 2. Woche p.i. Auch hier überwiegen IgG₂ a und b. (Usherwood et al. 1996b; Sangster et al. 2000).

CD 8^+ T-Zellen sind entscheidend für die Überwindung der MHV-68-Infektion. Normalerweise kommt es nach 4-6 Wochen zur Ausheilung der akuten Infektion durch die Wirkung von zytotoxischen T-Zellen und spezifischer neutralisierender Antikörper. Fehlen CD 8^+ Zellen, resultiert eine verstärkte Beteiligung der Lunge und eine beschleunigte Ausbreitung des Virus. Auch rezidivierende Infektionen in der Lunge wurden beobachtet. CD 8^+ Zellen sind nicht in der Lage, eine latente Infektion

zu verhindern, scheinen aber die Zahl infizierter B-Zellen zu kontrollieren (Stevenson et al. 1998;1999; Sangster et al. 2000; Etisham et al. 1993).

Die latente Persistenz von MHV-68

Bei infizierten Tieren können noch Monate bis Jahre nach der Infektion Virusantigene bzw. virale DNA in dendritischen Zellen, Makrophagen, Alveolarepithelzellen und B-Lymphozyten nachgewiesen werden, diese Zellen sind latent infiziert (Nash et al. 2001; Sunil-Chandra et al. 1992; Steward et al. 1998; Usherwood et al. 1996a; Flaño et al. 2000).

Vereinzelt wurde bis zu 60 Tage nach Infektion Virus-DNA in Leber, Niere, Knochenmark und Peyer'schen Plaques gefunden. In den Lungen infizierter Tiere kann noch nach 12 Monaten Virus-DNA nachgewiesen werden, die betroffenen Zellen sind Alveolarepithelzellen (Flaño et al. 2003; Steward et al. 1998).

Das Virus gelangt von der Lunge über die Lymphbahn in mediastinale Lymphknoten, wo der Kontakt zu den B-Zellen hergestellt wird. Die Infektion der B-Zellen führt initial zu einer raschen Zunahme dieser Zellen, um sich dann dauerhaft auf einem Niveau von ca. 1 auf $5 \cdot 10^5$ Milzzellen einzupendeln.

Das Virusgenom liegt in den dauerhaft infizierten Zellen episomal vor (Steward et al. 1998).

Interessanterweise ist es bislang nicht gelungen, in vitro eine MHV-68 positive B-Zelllinie zu etablieren. Es gelingt zwar, die Zellen in vitro mit Virionen zu infizieren, eine Zirkularisierung der DNA jedoch bleibt aus, ebenso eine Immortalisierung der Zellen. Je nach Kulturbedingungen sterben die Zellen nach 2-6 Wochen ab (Dutia et al. 1999).

Bekannte Modelle einer ZNS-Infektion mit MHV-68

Die intrazerebrale Inokulation des Virus, aber auch die Infektion immunkompromittierter Tiere, die mit sehr hoher Viruskonzentration im Blut einhergeht, kann zu einer Infektion des ZNS mit replikativer Virusvermehrung führen. Zeichen der Infektion sind in den Meningen und perivaskulär zu finden. Dies deutet auf eine hämatogene Ausbreitung hin.

Neben den Meningen und Ependymzellen sind Pyramidenzellen des Hippocampus, Oligodendrozyten und Bergmannsche Gliazellen betroffen (Terry et al. 2000). Diese Form der Infektion endet in der Regel letal.

Ziel dieser Arbeit

Die bekannten Mausinfektionsmodelle sollen so abgewandelt werden, dass die Primoinfektion stets auch zu einem Befall des ZNS führt. Zum Erreichen dieses Ziels waren neben den infektionskinetischen Untersuchungen an der Maus auch geeignete virusdiagnostische und molekularbiologische Methoden zu etablieren. Im Einzelnen waren folgende Aufgaben zu lösen:

1. Anzucht des Virus, Vermehrung und Bestimmen des Infektionstiters
2. Bestimmen der geeigneten Infektionsmethode und des optimalen Infektionszeitpunktes
3. Quantifizierung von Viren im ZNS und in ausgewählten Organen
4. Etablieren einer Real-Time-PCR zum quantitativen Virusnachweis
5. Nachweis von Transkriptionsaktivität im Gewebe
6. Nachweis viraler m-RNA mittels Nukleinsäureamplifikation
7. Nachweis viraler Antigene in Gewebeschnitten
8. Etablieren einer permanent wachsenden MHV-68-positiven Zelllinie

2 Material

Für die Versuche wurden die im Folgenden aufgeführten Materialien verwendet. Allgemein gebräuchliche Laborchemikalien werden nicht im Einzelnen genannt.

2.1 Tiere und Organe

Verwendet wurden BALB/c (Acy1s, Alada, Carb, Cas1a, Cd5b, Cd72b, Cd8ab, Cd8b1b, Ce2a, Es1b, Esda, pi1a, Gusa, H6pdb, Hbab, Hbbd, Hc1, Idh1a, Mod1a, Mup1a, Pepca, Pgm1a, Thy1b, Trfb)

Mäuse von Taconic, Dänemark. Es wurden jeweils Muttertiere mit einem kompletten Wurf verwendet. Die Tierversuche wurden genehmigt von der Bezirksregierung Köln unter der Nummer: 50.203.2-AC 2,43/02.

Die Organe wurden entsprechend der Fragestellung den Tieren entnommen (detaillierte Angaben zur Versuchsplanung finden sich im Abschnitt 3.1).

2.2 Gewebeschnitte

Die fixierten und paraffinierten Gewebeschnitte wurden freundlicherweise von Frau Evelyn Alberg, Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Aachen (ehem. Direktor: Prof. Dr. Schröder) zur Verfügung gestellt.

2.3 Zelllinien

Die Zelllinie BHK-21 wurde 1961 aus Nierengewebe neugeborener Hamster etabliert (MacPherson et al., Virology 16: 147-151 (1962)). Die Zellen sind immortal und wachsen adhärent. Sie eignen sich für die Vermehrung von MHV-68. Die Zelllinie stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig.

2.4 Bakterien

Es wurde der Laborstamm *E.coli* One Shot™ TOP 10 (Invitrogen) vom Genotyp F⁻ *mrcA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74recA1 deoR araD139 D(ara-leu)*7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* verwendet.

Diese Bakterien wurden zur Vermehrung der Gen-50 Amplifikate (Plasmide) verwendet.

2.5 Vektoren

Der Vektor pcDNA 3.1/V5-His TOPO (Invitrogen™) liegt linear mit zwei freien dT' Enden vor, so dass PCR-Produkte direkt einkloniert werden können. Er trägt ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion transformierter Bakterien.

Der Vektor ist in Abb. I dargestellt.

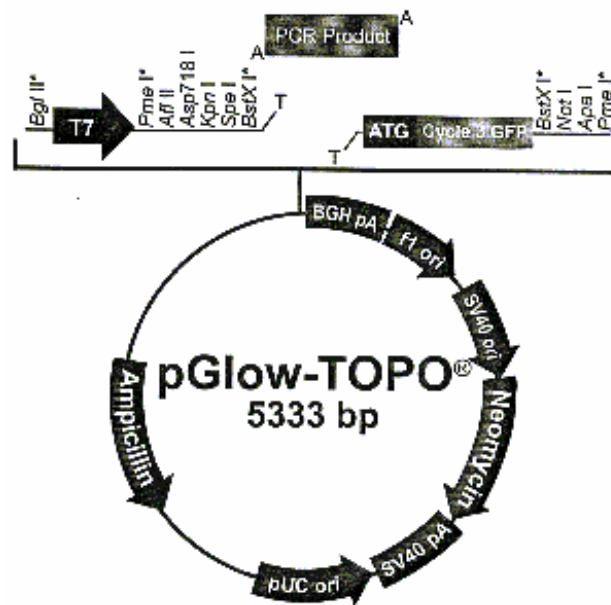


Abb. I: pGlow-TOPO Vektor (Invitrogen™)

2.6 Oligonukleotide

Gen	Primernamen	Sequenz	Länge des Produktes in bp
MHV-68 M2-Gen	MHV-68 M2a 3'	5'-caa aat cca gtg cta tgg ggt g- 3'	379
	MHV-68 M2a 5'	5'-tcg agc cag agt cca aca tca t- 3'	
	MHV-68 M2b 3'	5'-acg tta aag tcc cca tgg aag c- 3'	144
	MHV-68 M2b 5'	5'-taa gga cct cgt aga gat tgg c- 3'	
MHV-68 M3-Gen	MHV-68 M3a 3'	5'-taa cag gca gat tgc cat tcc c- 3'	381
	MHV-68 M3a 5'	5'-tgg cac tca aac ttg gtt gtg g- 3'	
	MHV-68 M3b 3'	5'-tct tat gtg gat gtg ggc atg c- 3'	133
	MHV-68 M3b 5'	5'-att ctt cag aga tgg cgc cca ag- 3'	
MHV-68 M7-Gen	MHV-68 M7a 3'	5'-cgg act gtc agc ggt ttc agg- 3'	487
	MHV-68 M7a 5'	5'-gtc cga tcc cac cac ctc ag- 3'	
	MHV-68 M7b 3'	5'-att ttg gga agg ggt ggt tg- 3'	128
	MHV-68 M7b 5'	5'-cca cct cca atg cag atg ttt c- 3'	
MHV-68 G50-Gen	MHV-68 G50a 3'	5'-tcg ctt gtt tct ggg gag gtt t- 3'	425
	MHV-68 G50a 5'	5'-gat gga aac aga aaa cga gcc c- 3'	
	MHV-68 G50b 3'	5'-agg gct aat ggg tga aaa tgg c- 3'	293
	MHV-68 G50b 5'	5'-aaa agt tct gca tcc cag acc c- 3'	
MHV-68 ORF 6	MHV-68 ORF-6 3'	5'-tca cgt aca gga cag agt tg- 3'	387
	MHV-68 ORF-6 5'	5'-aga gct act aca cca acg tg- 3'	
MHV-68 ORF-25	MHV-68 ORF-25 3'	5'-agc agt cac aac att ccc tc- 3'	472
	MHV-68 ORF-25 5'	5'-aac gtc agc tct cca gtt tg- 3'	
MHV-68 ORF-27	MHV-68 ORF-27 3'	5'-gaa gag tag tcc tat aat cag- 3'	219
	MHV-68 ORF-27 5'	5'-ttg tat ggt act tgg gca gag- 3'	
MHV-68 ORF-57	MHV-68 ORF-57 3'	5'-tac acg tgt tct cag agt g- 3'	242
	MHV-68 ORF-57 5'	5'-aca tac tca tgt cta ctt cag- 3'	
MHV-68 ORF-59	MHV-68 ORF-59 3'	5'-aga gtc aag ttt cac gcc tg- 3'	254
	MHV-68 ORF-59 5'	5'-gga act gag gaa tca gag tc- 3'	
Murine GAPDH	Maus-GAPDH 3'	5'-tgc tct cca ctt ggc aaa gtg- 3'	236
	Maus-GAPDH 5'	5'-agc ctt ctc cat ggt ggt gaa- 3'	

Alle Primer wurden bezogen von Sigma ARK, Steinheim

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper:

Die Antikörper gegen MHV-68 wurden nach Infektion der Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Blut gewonnen.

2.7.2 Sekundärantikörper:

Kaninchen anti- Maus-Immunglobuline FITC-konjugiert (DAKO, Dänemark)
oder Ziege anti-Maus-Immunglobuline nicht konjugiert (DAKO, Dänemark)

2.7.3 Tertiärantikörper:

Kaninchen anti-Ziege-Immunglobuline FITC-konjugiert (DAKO, Dänemark)

2.8 Virus

MHV-68 wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herr Dr. M. Messerle, Abteilung für Virologie, Max von Pettenkofer Institut, LMU-München. Die Viren wurden in BHK-21 Zellen vermehrt und bei -70 °C gelagert.

2.9 Spezielle Testsysteme

Desoxynucleoside Triphosphate Set	Roche, Mannheim
EasyPrep® Plasmid Mini Prep Kit	Biozym, Oldendorf
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
HiSPEED Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript® RT Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp® DNA-Blood Mini-Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp® DNA Mini-Kit	Qiagen, Hilden
RedTaq™ ReadyMix™ PCRReactionMix	Sigma, Steinheim
Rneasy® Mini-Kit	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase Kit	Qiagen, Hilden

2.10 Chemikalien

Ampicillin	Roche, Mannheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA, Österreich
Desoxynucleosid Triphosphate Set	Roche, Mannheim
Dextransulfat 500 Na-Salz	Serva, Heidelberg
DNA-Molecular Weight Marker XIV (100 bp)	Roche, Mannheim
Eindeckmedium	BAG, Lich
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma, Steinheim
Evansblue 2 %	Euroimmun, Lübeck
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin
L-Glutamin (Stammlsg. 200 mM)	Sigma, Taufkirchen
Lipopolysaccharide (E-coli O55:B5)	Sigma, Steinheim
Milchpulver	Sigma, Steinheim
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma, Taufkirchen
Nicht essentielle Aminosäuren 100* (NEA)	Biochrom KG, Berlin
Penicillin (200 mM)-Streptomycin (1 mg/ml)-Lösung	Sigma, Taufkirchen
Primer p(DT) 15 for c-DNA synthesis	Roche, Mannheim
PufferR+mitBSA	MBI Fermentas
RNAlater (Konservierungsstoff für RNA-haltige Proben)	Ambion, England
RPML-1640 Medium	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	Sigma, Steinheim

2.11 Enzyme

DNase I (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Hind III (10 U/μl)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Protease	Qiagen, Hilden
Protector RNase Inhibitor (40 U/μl)	Roche, Mannheim
Proteinase K	Qiagen, Hilden

Xho I (10 U/μl)

MBI Fermentas, St.Leon-
Rot

2.12 Geräte

Centrifuge 5403 (Kühlzentrifuge)

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf centrifuge 5414c (für 1,5/2ml

Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäße)

Fluoreszenzmikroskop

Zeiss, Jena

Gene Quant II (RNA/DNA-Calculator)

Pharmacia Biotech

Labofuge GL (für Zellsusp.)

Kendro, Langenselbold

Lichtmikroskop

Zeiss, Jena

Lightcycler

Roche, Mannheim

Retsch Mixer Mill 300 (MM 300)

Retsch, Haan

Thermocycler UNO II

Biometra, Göttingen

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

2.13 Zellkulturmedien

2.13.1 Medium für BHK-21 Zellen

Minimum Essential Medium Eagle

5 % FKS (1 % für Virustitrationsversuche) (v/v)

2 % Penicillin-Streptomycin (v/w)

0,2 % NEA (v/w)

2.13.2 Medium für primäre Mauslymphozyten

RPML-1640

20 % FKS (v/v)

2 % Penicillin-Streptomycin (v/w)

2 mM L-Glutamin

12,5 μg/ml Lipopolysaccharide (*E-coli* O55:B5)

20 μg/ml Dextransulfat

0,2 % NEA (v/w)

2.13.3 Medium für etablierte MHV-68 positive Lymphozytenkultur

RPML-1640

10 % FKS (v/v)

2 % L-Glutamin (v/w)

2 % Streptomycin-Penicillin (v/w)

0,2 % NEA (v/w)

2.14 Verwendete Lösungen und Puffer

1x PBS (pH 7,4)

NaCl 140 mM

KCl 3 mM

Na₂HPO₄ 10 mM

K₂HPO₄ 2 mM

0,5x TBE

Tris-Puffer 45 mM

Essigsäure 45 mM

EDTA (pH 8,0) 1 mM

LB-Medium (pH 7,0)

NaCl 1,0 % (w/v)

Pepton 1,0 % (w/v)

Hefeextrakt 0,5 % (w/v)

SOC-Medium

Bactotrypton 2,0 %

Hefeextrakt 0,5 %

NaCl 10 mM

KCl 25 mM

MgCl₂ 10 mM

MgSO₄ 10 mM

Glucose 20 mM

2.15 Materialien für Zellkulturen

Cellstar Gewebekulturflaschen (50 ml/ 25 cm²)

Falcon Multiwell 24 Well

Chamber-Slide System Lab-Tek II

Greiner Bio One, Frickenhausen

Becton Dickinson Europe

Nalge Nunc int. Corp., USA

3 Methoden

3.1 Organentnahme und -aufbewahrung

Die Mäuse wurden bei Krankheitszeichen oder Tod, ansonsten an den Tagen 7, 14 oder 35 nach Virusinokulation getötet. Dies geschah mit einer Überdosis Isofluran. Es folgte eine Herzpunktion zur Blutgewinnung. Anschließend wurden die Organe unter sterilen Bedingungen entnommen. Für die virologischen Untersuchungen wurden die Proben bei -70°C archiviert. Für die histopathologische Aufarbeitung wurden die Proben in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Folgende Organe und Gewebe wurden entnommen:

Milz, Leber, Niere, Herz, Lunge, Psoasmuskel, Thymus, Großhirn, Kleinhirn

3.2 Kultivierung von BHK-21 Zellen

BHK-21 Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden nach jeweils 7 Tagen subkultiviert: nach Trypsinierung lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen ab. Sie wurden in 10 ml frischem Kulturmedium (v/v) resuspendiert. Diese Suspension wurde mit Medium auf 100 ml aufgefüllt, je 10 ml wurden auf neue Kulturflaschen verteilt.

3.3 Isolieren von Lymphozyten aus MHV-68 infizierten Mäusen

Milzgewebe MHV-68-positiver Mäuse wurde unmittelbar nach Entnahme durch Zellfilter (Greiner Bioone) gedrückt. Das entstandene Zellhomogenisat wurde mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Sichtbare lymphozytenhaltige Banden wurden isoliert und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Die Lymphozyten wurden in Konzentrationen von 10^1 bis 10^6 Zellen/ml in Spezialmedium (2.13.2) resuspendiert und in Vertiefungen von 24-Well-Platten gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂. Die Zellen wurden mit 10^6 Viren/ml inkubiert.

Nachdem die Zellen eine stabile Teilungsquote erreicht hatten, wurden sie in 50 ml Kulturflaschen umgesetzt. Die Vermehrung verlief weiter kontinuierlich.

3.4 Archivieren adhärenter Zellen

BHK-21-Zellen einer gut bewachsenen Zellkulturflasche wurden mittels Trypsinierung vom Flaschenboden gelöst und in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 1 ml in Zentrifugengefäße gegeben und die Zellen 5 Minuten bei 1.600 rpm pelletiert (Labofuge^{GL}, Kendro). Nach dem Dekantieren des Überstands wurde jedes Zellsedimentpellet in 1 ml Lösung A resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Lösung B wurden die Lösungen durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Mischung wurde in Kryoröhrchen überführt und in einer Polystyrol-Box bei -70 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Lösung A (für 10 Kryoröhrchen)

Medium ohne Zusätze	7,5 ml
FKS	2,5 ml

Lösung B (für 10 Kryoröhrchen)

Medium ohne Zusätze	5,5 ml
FKS	2,5 ml
DMSO	2,0 ml

3.5 Archivieren von Zellen aus Suspensionskultur

In Suspension wachsende Zellen wurden in 5 ml Einheiten in Zentrifugenröhrchen überführt und weiterhin wurde entsprechend dem Einfrierprotokoll für adhärenente Zellen verfahren.

3.6 Isolieren von DNA

3.6.1 Gewebe:

Für das Isolieren von DNA aus solidem Gewebe wurden die Proben zunächst homogenisiert. In ein 2 ml-Reaktionsgefäß wurde zu 25 mg Gewebe (Milz/ Thymus 10 mg) 180 µl Puffer sowie eine Stahlkugel mit 3 mm Durchmesser gegeben. Der Ansatz wurde zweimal für 20 sec bei 30 Hz in der Zelmühle MM 300 (Firma Retsch®) homogenisiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (*QIAmp DNA Mini-Kit*) wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 56° C in einem Thermoblock schüttelnd inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben für das *QIAmp DNA Mini-Kit*. Die DNA wurde in 200 µl Puffer AE eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.6.2 Blut und Zellsuspensionen:

Für die Isolierung von DNA aus Blut oder Zellsuspensionen wurde das *QIAmp DNA-Blood Mini-Kit* verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.7 Isolieren von RNA

Gewebeproben wurden in 10 mg-Einheiten mit Hilfe einer 3 mm Stahlkugel und 350-600 µl RLT-Puffer (*RNeasy Kit, Qiagen*) in der Zelmühle MM 300 2x für 1 Minute bei 20 Hz homogenisiert.

Die so entstandene Zellsuspension wurde nach Herstellerangaben mit dem *RNeasy-Kit* weiterbehandelt. Die RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -70 °C gelagert.

3.8 Spaltung mit DNase

Nach Isolieren der RNA (3.7) kann eine Verunreinigung mit genomischer DNA nicht völlig ausgeschlossen werden. Deshalb wurde die extrahierte RNA mit DNase I behandelt. Dieses Enzym ist eine Doppelstrang-spezifische Endonuklease aus Rinderpankreas.

Der Standard-Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte über 10 Minuten bei 95 °C.

Standard-Reaktionsansatz:

RNA (50 ng – 2 µg)	x µl
RNase Inhibitor (40 U/µl, Roche)	0,5 µl
Puffer für DNase I (10 x)	4,0 µl
DNase I, RNase-frei (10 U/µl, Roche)	2,0 µl
RNase-freies Aqua dest.	ad 40,0 µl

Puffer für DNase I (10 x):

Tris HCl (pH 7,5)	100 mM
-------------------	--------

3.9 C-DNA Synthese

Da RNA nicht direkt mittels PCR amplifiziert werden kann, muss sie zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dieses geschieht mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase - der Reversen Transkriptase (RT). Als Primer wurde ein Oligo(dT)-Primer eingesetzt, der an den poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA bindet. Das Enzym bindet an die freie 3'-OH-Gruppe des Primers und synthetisiert einen zur RNA-Matrize komplementären cDNA-Strang.

Die Synthese einzelsträngiger cDNA erfolgte mit dem *Omniscript*TM RT-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Es wurden RNA-Mengen zwischen 50 ng und 2 µg als Matrize eingesetzt.

Die isolierte DNA-freie RNA wurde auf Eis aufgetaut und 5 Minuten bei 65 °C denaturiert (Thermomixer 5436, Eppendorf). Nachdem eine geeignete Menge des Standard-Reaktionsansatzes zugesetzt worden war, erfolgte die Transkription 1 Stunde bei 37 °C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten auf 95 °C (Thermomixer 5436, Eppendorf) erhitzt, um die Reaktion zu stoppen, dann sofort auf Eis gekühlt.

Standard-Reaktionsansatz:

RNA	20 µl
10 x RT-Puffer	4,0 µl
dNTP-Mix (5 mM)	4,0 µl
Oligo(dT)-Primer (10 µM, Roche)	4,0 µl
RNase Inhibitor (10 U/µl, Roche)	0,5 µl
Omniscript RT (4 U/µl)	2,0 µl
RNase-freies Aqua bidest.	15,5 µl

3.10 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Das Vorhandensein von Nukleinsäuren kann photometrisch bei 260 nm im Spektralphotometer *GeneQuant II* (Pharmacia Biotech) gemessen werden. Eine Extinktion $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg DNA pro ml Lösung.

Die DNA-Konzentration berechnet sich nach der Formel: $\text{DNA (µg/ml)} = \text{OD} \times \text{spezifische Verdünnung} \times 50$.

3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der *polymerase chain reaction* (PCR) (SAIKI *et al.*, 1988) wurde im Jahre 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Die Methode macht es möglich, Nukleotidsequenzen *in vitro* millionenfach zu vervielfältigen. Dadurch werden auch sehr geringe Mengen an DNA leicht nachweisbar.

Bei der PCR werden zwei Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die homolog zu den beiden Enden der Zielsequenz sind. Die doppelsträngige DNA wird zunächst denaturiert. In der Annealingphase hybridisieren die Primer an die einzelsträngige Matrizen-DNA. Ein hitzestabiles Enzym, die *Taq*-Polymerase, synthetisiert während der Elongation vom 3'-Ende der Primer ausgehend einen neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Aufgrund einer zyklischen Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte - Denaturierung, Annealing und Elongation - wird die Matrizen-DNA exponentiell amplifiziert.

3.11.1 Konventionelle PCR

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Thermocycler UNO II, Biometra) unter *Hot-Start*-Bedingungen durchgeführt.

Der Reaktionsansatz wurde mit Readymix™ hergestellt, der alle für die Amplifikation nötigen Reagenzien (Nukleotide, *Taq*-Polymerase, MgCl, PCR-Puffer) in Standardkonzentrationen enthält.

Standardreaktionsansatz:

DNA bzw. cDNA	5 µl
Readymix	25 µl
Primer 3' (10 µM)	2 µl
Primer 5' (10 µM)	2 µl
Aqua bidest	16 µl

Zur Erhöhung der Sensitivität wurde für ausgewählte Gene eine nested-PCR durchgeführt, d.h. ein Teil des PCR-Produktes wird erneut in eine PCR eingesetzt. Hierbei werden Primer verwendet, die innerhalb des bereits amplifizierten DNA-Fragmentes liegen.

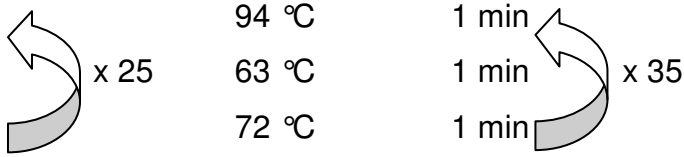
Standardreaktionsansatz:

PCR-Produkt	2 µl
Readymix	25 µl
Primer 3' (10 µM)	2 µl
Primer 5' (10 µM)	2 µl
Aqua bidest	19 µl

3.11.2 Bedingungen für spezifische PCR-Reaktionen

Die Amplifikation der MHV-68-Gene G 50, M 2, M 3 und M 7 wurde unter folgenden PCR-Bedingungen durchgeführt:

Äußere PCR:		Nested PCR:	
94 °C	2 min	94 °C	2 min
94 °C	1 min	94 °C	1 min
60 °C	1 min	63 °C	1 min
72 °C	1 min	72 °C	1 min
72 °C	5 min	72 °C	5 min
4 °C	∞	4 °C	∞



Die Amplifikation der Gene ORF 6, ORF 25, ORF 27, ORF 57 und ORF 59 wurde unter folgenden PCR-Bedingungen durchgeführt:

PCR:

94 °C	2 min	
94 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	x 30-40
4 °C	∞	

Die Amplifikation des Murine-GAPDH Gens wurde unter folgenden PCR-Bedingungen durchgeführt:

PCR:

94 °C	2 min	
94 °C	1 min	
54 °C	45 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	x 45
4 °C	∞	

3.11.3 Agarosegel-Elektrophorese

Für den Nachweis von DNA-Amplifikaten nach PCR ist die Agarosegel-Elektrophorese geeignet. Die negativ geladenen DNA-Amplifikate wandern im elektrischen Feld und werden nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die als Träger verwendete Agarose ist ein Polysaccharid aus Rotalgen. Es wird durch Aufkochen in Puffer gelöst und polymerisiert beim Abkühlen. Durch Variation der Agarosekonzentration können lineare DNA-Fragmente der Größe 0,1 bis 60 kb getrennt und dargestellt werden [GASSEN & SCHRIMPF, 1999].

DNA-Fragmente ≤ 1 kb werden dabei auf 1,5 %ige TBE-Agarosegele aufgetragen. Zur Herstellung der Gele wird das Agarose-Puffer-Gemisch solange in einer Mikrowelle erwärmt, bis die Agarose gelöst ist. Nach Abkühlen auf 65 °C wird den Agarosegelen Ethidiumbromid zugegeben. Dieses interkaliert in DNA und

fluoresziert bei Anregung mit Lichtwellen von 302 nm, so dass eine optische Darstellung der Banden möglich ist.

Parallel zu den Proben wird ein Größenmarker mit DNA-Fragmenten definierter Länge aufgetragen. Dies erlaubt die Bestimmung der Größe der zu untersuchenden Proben. Die Elektrophorese erfolgt in 0,5 x TBE-Puffer und die DNA wird bei 5 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgt durch die „BioDoc Analyze Camera“ (Biometra) und digitale Speicherung.

TBE-Puffer (0,5 x):

Tris	45 mM
Borsäure	45 mM
EDTA	1 mM

TBE-Gel, 1,5 %ig (500 ml):

Agarose	7,5 g	
TBE-Puffer	(0,5 x) 500 ml	→ erwärmen, auf 65 °C abkühlen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	5 µl	

Farbmarker:

Ficoll Polymer	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylemcyanol	0,25 % (w/v)
EDTA	0,25 M

Größenmarker:

DNA-Längenstandards XIV, 100-Basenpaarleiter: 0-2500 bp (Roche)

3.12 Real-Time-PCR

Die LightCycler-Technologie kombiniert „*rapid cycle-PCR*“ und „*Real-Time-PCR*“ miteinander. Verwendet werden hierzu Glaskapillaren mit nur 20 µl Reaktionsvolumen, dadurch wird das Verhältnis des Flüssigkeitsvolumens zur Oberfläche und damit die Temperaturübertragung optimiert. Schnelle

Temperaturveränderungen im Reaktionsgefäß sind somit möglich, so daß ein PCR-Zyklus weniger als 30 Sekunden dauert (*rapid cycle-PCR*). Die Analyse der PCR-Produkte erfolgt während der Amplifikation mittels Fluoreszenz (*real-time-PCR*). Ein zusätzlicher Analysenschritt entfällt und die Gefahr von Kontaminationen wird minimiert. Im Anschluß an die PCR wird der Schmelzpunkt des Amplikons ermittelt. Für jedes Amplifikationsprodukt besteht eine charakteristische Schmelztemperatur. Diese ist abhängig von den gewählten PCR-Bedingungen, den eingesetzten Primern und der Amplifikationsmethode.

Die Detektion der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte mittels *SYBR Green I* Farbstoff (s.u.).

3.12.1 Nachweis der Amplifikate mittels *SYBR Green I*

Für den Nachweis von PCR-Amplifikaten mittels *SYBR Green* wurde das *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit* (Roche) verwendet. Der Farbstoff *SYBR Green I* interkaliert mit doppelsträngiger DNA. Durch Anregung mit UV-Licht sendet *SYBR Green I* Lichtquanten aus, die bei 530 nm gemessen werden. Die Detektion von PCR-Produkten erfolgt in der Elongationsphase, in der doppelsträngige DNA entsteht. Die Messung erfolgt beim Übergang der lag-Phase in die log-Phase. Da *SYBR Green I* nur beim Interkalieren angeregt werden kann, lässt sich der Schmelzpunkt der Produkte bestimmen, indem in einem abschließenden Schritt die Produkte erhitzt werden, bis bei erreichtem Schmelzpunkt die Fluoreszenz plötzlich stark abnimmt (Denaturierung der doppelsträngigen DNA).

3.12.2 Bedingungen für die Real-Time PCR

Für die Amplifikation von Gen-50 wurden Primer verwendet, die auch in der konventionellen PCR zum Einsatz kamen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenstandard mitgeführt, d.h. eine bekannte Menge spezifischer DNA, die ermöglicht, durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten die Menge der eingesetzten DNA zu errechnen.

Als Größenstandard diente ein Vektor mit einklonierter Gen-50 Gensequenz. Hiervon wurden verschiedene Verdünnungen eingesetzt (10^2 bis 10^6 Genomäquivalente/ μ l).

Auch hier wurde eine Nested-PCR durchgeführt. Dabei wurden in einem ersten Schritt mittels konventioneller PCR DNA-Amplifikate der Proben gewonnen, die in einem zweiten Schritt als Proben in eine Real-Time PCR eingesetzt wurden.

Gen-50 PCR:

Ansatz:

DNA	5 µl (bzw. 2 µl Standardverdünnung)
MgCl (2,5 mM)	2,5 µl
PCR-Puffer 10*	5 µl
dNTP's (2,5 mM)	5 µl
Primer 3' (10 pmol/µl)	2 µl
Primer 5'	2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
Aqua bidest	28 µl (bzw. 31 µl)

PCR-Bedingungen:

94 °C	2 min	
94 °C	1 min	 x 15
60 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Real-Time PCR von Gen-50:

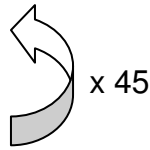
Ansatz:

PCR-Produkt (äußere PCR)	2 µl
MgCl (25 mM)	2,5 µl
Primer 3'	1 µl
Primer 5'	1 µl
Fast Start Reaktionsmix	2 µl

Der Fast Start Reaktionsmix enthält PCR-Puffer, Taq-Polymerase, MgCl (10 mM) und dNTP's.

Realtime-PCR-Bedingungen:

Denaturierung	10 min	95 °C
Amplifikation	0 s	95 °C
	10 s	63 °C
	5 s	72 °C
Schmelzkurve	ab	83 °C
Kühlung	1min	40 °C



3.13 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

Der indirekte Immunfluoreszenztest dient dem Nachweis von Virusantigenen in Zellen bzw. Geweben. Dabei werden Antikörper gegen virale Epitope mit der Probe inkubiert. Es resultiert eine Antigen-Antikörperreaktion, die durch fluoreszenzmarkierte Anti-Antikörper nachweisbar wird. Durch Anregung mit UV-Licht, z.B. bei 519 nm werden spezifische Virusantigene unter dem Fluoreszenzmikroskop lokalisiert. Da die Methoden für Zellen und Gewebe sich recht stark unterscheiden, werden sie getrennt dargestellt.

3.13.1 Immunfluoreszenztest für Zellen

a) Adhärenente Zellen

Zu einem Monolayer ausgewachsene BHK-21-Zellen wurden mit Trypsin abgelöst (siehe 3.2) und in 35 ml Medium (5 % FKS v/v) resuspendiert. Je 500 µl der Zellsuspension wurde in Chamber-Slide-Objektträger gegeben.

MHV-68 negative BHK-Zellen wurden bis zum vollständigen Bewuchs inkubiert (37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂).

Für MHV-68 positive Zellkulturen wurden die Kammern 24 h nach Befüllung mit 10⁴ pfu (siehe 3.15) Virus beimpft und weitere 2 Tage inkubiert.

Anschließend wurde das Medium entfernt und die Kammern von den Objektträgern gelöst.

Um die Zellen auf den Objektträgern zu fixieren wurden diese für 10 Minuten in eiskaltes Aceton gegeben. Die fixierten Zellen wurden bis zur Versuchsdurchführung bei -20 °C gelagert.

b) Vorbereitung der Suspensionszellen

Aus den Kulturflaschen wurde 1 ml Zellsuspension entnommen und bei 1500 rpm (Eppendorf 5415c) 10 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert. Je 10 µl dieser Suspension wurden in ein Auftragsfeld eines 10-Feld-Objektträgers pipettiert. Nach 30-minütiger Trocknung bei 37°C erfolgte die Fixierung mittels eiskaltem Aceton für 10 Minuten.

Durchführung des Immunfluoreszenztestes:

Die Zellen auf den Feldern wurden mit 10 µl MHV-68-Antiserum (Verdünnung 1:200 in PBS v/v) überschichtet und 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend wurden die Objektträger 3x5 min in PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Die einzelnen Felder wurden dann mit 10 µl Sekundärantikörper (Kaninchen anti-Maus IgG, FITC-gekoppelt 1:30 in PBS V/V) überschichtet und 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Danach wurde wiederum 3x5 min in PBS gewaschen, wobei beim 3. Waschschrift 50 µl Evans Blue zur Gegenfärbung zugegeben wurden.

Die fertig bearbeiteten Präparate wurden mit einem Tropfen „antifading“ Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckt und direkt am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet oder bei -20 °C gelagert.

3.13.2 Immunfluoreszenztest an Gewebeschnitten

Zunächst mussten die Schnitte entparaffiniert und gewässert werden. Hierzu wurden die Objektträger in Küvetten 20 min in Xylol, anschließend in absteigender Reihe je 7 min in 100 %igem, 96 %igem und 70 %igem Ethylalkohol und abschließend für 2 min in Aqua bidest. inkubiert.

Durch die Fixierung und Paraffinierung der Schnitte leiden die Antigene. Zur Verbesserung der Antigenität wurden die Proben in Zitratpuffer 20 min gekocht und langsam wieder auf Raumtemperatur gebracht.

Vor der weiteren Behandlung wurden die Schnitte 3*5 min in PBS gewaschen.

Um unspezifische Antigenbindungsstellen zu blockieren wurden die Gewebe noch 30 min in 100 ml PBS (supplementiert mit 1 g BSA und 0,2 g Milchpulver) inkubiert (geblockt) und anschließend 3x5 min in PBS gewaschen.

Die Gewebeschnitte wurden mit 200 µl Primärantikörper (Mausserum 1:200 in PBS) überschichtet und 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 3x5 min in PBS gewaschen.

Weiterhin wurden die Schnitte mit 200 µl Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG 1:100 in PBS) überschichtet und 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert, und wie bereits beschrieben gewaschen.

Die letzte Inkubation erfolgte mit 200 µl Tertiärantikörper (Kaninchen anti-Ziege IgG gekoppelt mit FITC 1:30 in PBS) wiederum bei 37 °C in der feuchten Kammer. Gewaschen wurde mit folgender Modifikation:

Beim letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe von 50 µl Evansblue zum Gegenfärben. Anschließend wurde eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte durch Photographie. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20 °C.

3.14 Vermehrung von MHV-68

BHK-21 Zellen eignen sich für die Vermehrung von MHV-68. Die Viren durchlaufen in den Zellen einen lytischen Zyklus.

Es wurden die Zellen einer gut bewachsenen Kulturflasche mit 2 ml Trypsin abgelöst, in 50 ml Medium (BHK-21 Standardmedium) aufgenommen und auf 5 neue Kulturflaschen verteilt. Nach 24 h Kultivierung bzw. bei Erreichen von 50-60 % Konfluenz wurden die Zellen mit 100 µl Virussuspension (entspricht ca. 10^6 pfu) infiziert.

Nach 3-4 Tagen wurden die Überstände gepoolt, bei 2000 rpm für 10 min in der Labofuge GL (Kendro) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -70 °C eingefroren. Die Pellets wurden verworfen. Der Virusnachweis erfolgte mittels G-50 PCR oder durch Nachweis eines zytopathischen Effektes.

3.15 Virustitration

Die Quantifizierung zytopathogener Viren erfolgt über den zytopathischen Effekt. Dabei wird eine virushaltige Suspension in einer logarithmischen Reihe verdünnt. Mit den Verdünnungen werden im Mehrfachansatz Zellkulturen infiziert. Die Menge an infektiösem Material wird in plaque forming units (pfu) angegeben.

(Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162, 480-483 (1931). Zur Quantifizierung der MHV-68 Virionen wurden BHK-21 Zellen in zwei 24-well-Platten 24 h kultiviert, bis die Böden zu ca. 60 % bewachsen waren. Das Kulturmedium wurde verworfen und die Zellen wurden mit Verdünnungen der Virussuspension ($1:10^{-3}$ bis $1:10^{-12}$) in BHK-Medium (1 % FKS) 10 Tage inkubiert. Die Virusverdünnung wurde im Vierfach-Ansatz getestet. Die Kontrollen enthielten virusfreies Medium.

Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop kontrolliert und die Ergebnisse protokolliert. Am 10. Tag nach Infektion wurde dokumentiert, welche Vertiefungen noch bewachsen waren und welche nicht.

Die Verdünnungsstufen, bei denen eine teilweise oder vollständige Lyse vorlag, wurden in die Kaerber-Formel ($\lg ID_{50} = L_{1,0} + L(\text{Int}) \times (S - 0,5)$) eingesetzt. Errechnet wurde die Zahl an plaque forming units in der Stammlösung.

3.16 Anzucht von MHV-68 aus Gewebeproben

Infektiöse Viruspartikel im Gewebe wurden mittels Virustitration nachgewiesen. Den Gewebeproben wurde 10 mg Material entnommen und in 1 ml BHK-Medium (2.13.1; 1 % FKS) zweimal für 20 Sekunden bei 30 Hz in der Zelmühle MM 300 homogenisiert. Die Zellreste wurden 10 min bei 1700 rpm in der Zentrifuge 5414c abzentrifugiert.

Der Überstand wurde gewonnen und Verdünnungen von 1:10 bis 1: 10.000 (v/v) hergestellt. Weiter wurde wie bei der Virustitration (3.15) verfahren. Ein Absterben der mit den Verdünnungen inkubierten BHK-21 Zellen wurde als positiver Befund gewertet.

3.17 Herstellung von Größenstandards für die Real-Time-PCR

Für die Quantifizierung von DNA mittels Real-Time PCR wird eine definierte Menge an spezifischer DNA benötigt, die als Standard dient und es möglich macht, durch Vergleich der Fluoreszenzintensität die Menge an gesuchter DNA in der Probe zu berechnen. Dazu sind Vektoren geeignet, die den spezifischen Genabschnitt enthalten. Es resultieren genau quantifizierbare DNA-Einheiten. Sie lassen sich in

beliebiger Menge in Bakterien vermehren und können für die Quantifizierung spezifischer PCR-Produkte verwendet werden.

3.17.1 Plasmidgenerierung und Transformation

Als spezifische DNA wurde der G-50 Abschnitt zwischen den G-50 a Primern gewählt. Dieser DNA-Abschnitt wurde mittels konventioneller PCR amplifiziert.

Zur Verminderung von Verunreinigungen wurde das Produkt in einem Agarosegel getrennt, die spezifische Bande wurde ausgeschnitten. Mit dem Gel-Extraction-Kit (Qiagen) wurde die DNA aus dem Gel extrahiert. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in pcDNA 3.1 Vektoren kloniert. Die Vektoren liegen linear vor, haben zwei freie Thymin-Enden, so daß sich die PCR-generierte DNA mit ihren zwei freien Adenin-Enden problemlos einfügen läßt. Es entsteht ein zirkulärer Vektor.

Dieser wurde mittels Hitzeschocktransformation in kompetente *E. coli* (One Shot™ TOP 10) eingebracht.

3.17.2 Selektion der transformierten Bakterien

Die Bakterien wurden in SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar mit Ampicillingehalt ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Vektoren enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen, so dass nur Klone wachsen, die den Vektor enthalten.

Die Kulturen wurden mit einer Öse aufgenommen und einzeln in jeweils 2 ml LB-Medium mit Ampicillin suspendiert und nochmals über Nacht bebrütet. Danach wurden sie direkt weiterverarbeitet oder bei 4 °C gelagert.

3.17.3 DNA-Minipräparation

Die Plasmid-Mini-Präparation erfolgte mit 1-2 ml der über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen mit dem *EasyPrep Plasmid Mini Prep Kit* nach Herstellerangaben.

3.17.4 Spaltung mit Restriktionsendonucleasen

Der Erfolg einer Klonierung wurde durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen überprüft. Bei der anschließenden Gelelektrophorese konnten die spezifischen G-50 Genabschnitte dargestellt werden.

Benutzt wurden die Restriktionsenzyme Hind III und Xho I. Gemeinsam mit den anderen unten angegebenen Reagenzien wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und die Lösung anschließend sofort auf Eis gegeben.

Plasmidlösung	10 µl
Puffer R+ 10*	2 µl
Xho I (10 U/µl)	0,4 µl
Hind III (10 U/µl)	0,4 µl
Aqua bidest.	7,2 µl

Die Produkte wurden über ein TBE-Gel geschickt, bei Banden in der spezifischen Länge konnte man davon ausgehen, daß diese Vektoren den gewünschten Genabschnitt enthielten.

3.17.5 DNA-Maxipräparation:

Die DNA-Maxipräparation wurde aus 200 ml einer über Nacht gewachsenen Bakteriensuspension durchgeführt. Die Isolierung der Plasmide aus dieser Bakteriensuspension erfolgte mit dem *HIGHSPEED Plasmid Purification Kit* nach Herstellerangaben. Es folgte eine Fällung mit 2,5 Volumenanteil eiskaltem absoluten Ethanol und 0,1 Volumenanteil 3 M Natriumacetat für 20 min bei 4 °C und 15000 rpm (Eppendorf-Centrifuge 5403). Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol für 10 min bei 4 °C und 15000 rpm gewaschen, vollständig getrocknet und in 100 µl Aqua bidest. resuspendiert.

3.18 Auswertung der Daten

Aufgrund der Datenstruktur erfolgte eine rein deskriptive Auswertung der Daten. Für die Diagramme wurde, soweit nicht anders beschrieben, jeweils der Median der genannten Population ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung neuer erforderlicher Methoden

4.1.1 Quantifizierung der infektiösen Virionen mittels Virustitration

Die Infektion der Mäuse erfordert definierte Mengen infektiöser Viruspartikel, die mittels Titration auf geeigneten Zellkulturen ermittelt wurden. Da die BHK-21 Zellen unter gewöhnlichen Kulturbedingungen nicht die erforderliche Zeit vital blieben, wurde der FKS-Gehalt so lange variiert, bis ein stabiler Bewuchs der Kulturplatten über 10 Tage gewährleistet war. Als optimal stellte sich eine FKS-Konzentration von 1% heraus. Nach 5-6 Tagen konnten keine Veränderungen des Bewuchses mehr festgestellt werden, 10 Tage der Kultivierung waren also ausreichend, um alle Veränderungen sicher zu erfassen. Mit dieser Methode wurde ein Virusgehalt von 10^7 pfu/ ml Stammlösung ermittelt. Für eine Infektion der Tiere mit etwa 10^5 pfu wurden 10 µl Stammlösung verwendet.

4.1.2 Qualitativer Nachweis viraler RNA und quantitativer Nachweis viraler DNA

4.1.2.1 RNA-Nachweismethoden

Der Nachweis viraler Transkriptionsaktivität im Gewebe gelang mittels Isolierung von mRNA. Die erfolgreiche Isolierung wurde durch Nachweis von Maus-GAPDH belegt, einem Housekeeping-Gen ähnlich der humanen GAPDH. Die aus den verschiedenen Organen gewonnene RNA wurde dann auf verschiedene virale Gene untersucht, die jeweils entweder dem lytischen Zyklus oder der Latenzperiode zugeordnet werden (siehe 3.11.1 und 1.2.6). Die nötigen Nukleinsäureamplifikationstechniken wurden nach institutseigenen Standardprotokollen etabliert und mit isolierter Virus-DNA getestet.

4.1.2.2 Etablierung einer quantitativen Real-Time PCR zum Nachweis viraler Gen-50-DNA

Um die Virusmenge im Gewebe zu bestimmen, wurde ein neuer Weg beschritten. Bisher wurde die Virusmenge unter Ausnutzung des zytopathischen Effektes, halbquantitativer konventioneller PCR oder anderer Methoden bestimmt. Für dieses Projekt wurde eine Real-Time-PCR etabliert. Dabei wurden definierte Mengen von Gen-50 DNA mitgeführt, die eine Quantifizierung der eingesetzten Menge an viraler

DNA per direktem Vergleich erlaubten. Damit wurde eine Sensitivität von 20 Kopien DNA/ mg Gewebe erreicht. Waren die Ergebnisse in seltenen Fällen nicht eindeutig, wurden die Reaktionsprodukte mittels Gelelektrophorese oder qualitativer PCR untersucht, um eine Aussage über den Infektionsstatus treffen zu können (siehe Abb. 1-3)

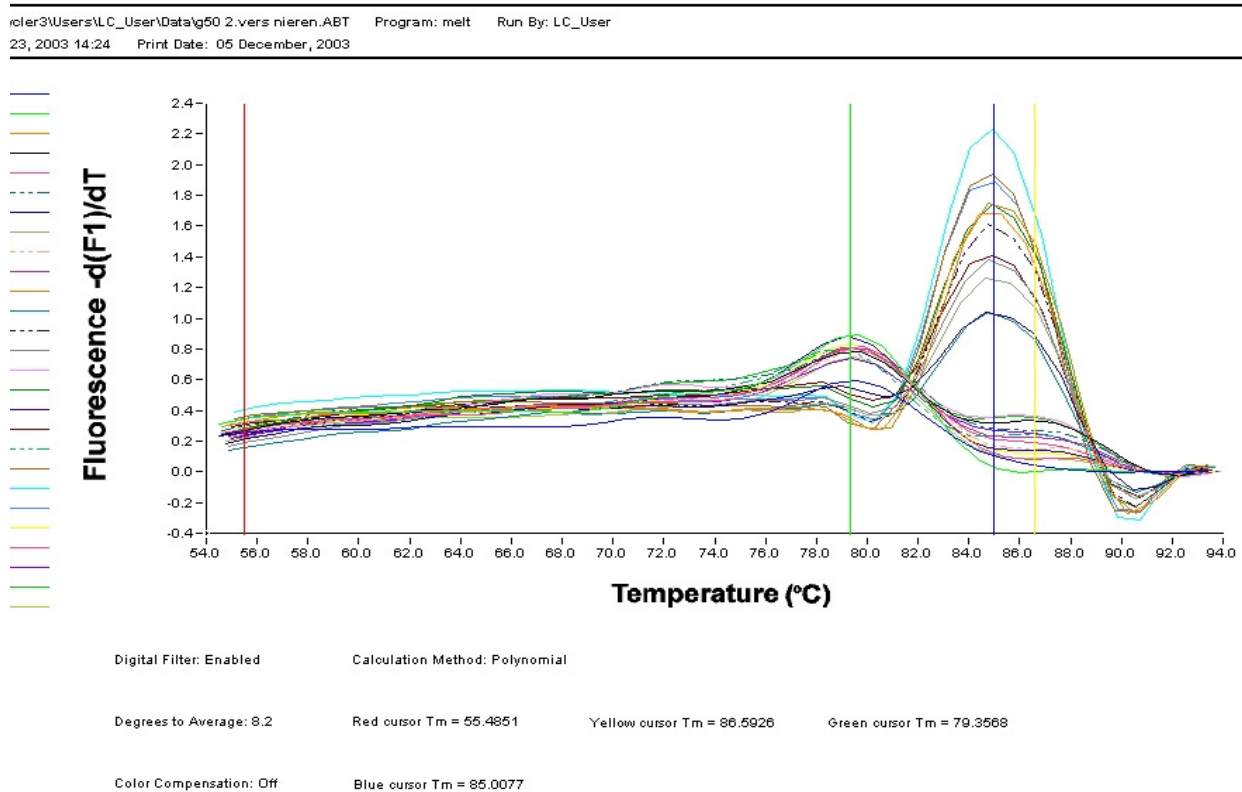


Abb. 1: Realtime-PCR Schmelzkurve des G 50 Gens mit spez. Peaks (lila), unspez. Peaks (grün) und nicht sicher zuordbare Peaks (gelb). Bei unklaren Ergebnissen wurden die Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 2)

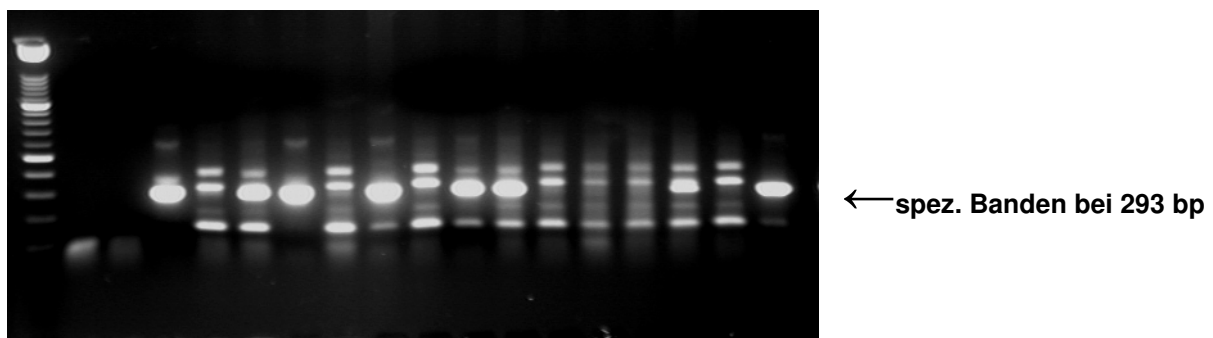


Abb. 2: Produkte der Real-Time-PCR nach Trennung mittels Gelelektrophorese.

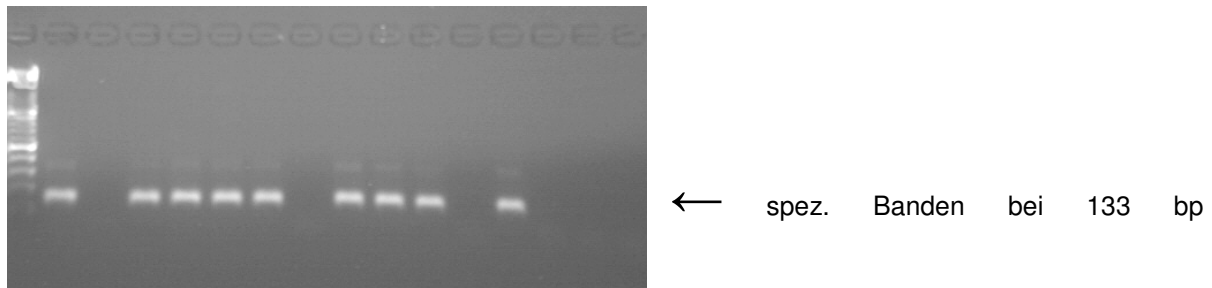


Abb. 3: M3 nested PCR mit spezifischen Banden bei 133 bp (Pfeil).

4.1.3 Methode zum Nachweis von Virusantigenen im Gewebe

Eine weitere Möglichkeit für den Virusnachweis und eine sichere Lokalisation der viralen Antigene bot die indirekte Immunfluoreszenz. Dafür wurden entparaffinierte Gewebeschnitte mit dem Serum MHV-68-Antikörper-positiver Mäuse inkubiert. Die in diesem Serum befindlichen spezifischen Antikörper banden an Virusantigenen und wurden in einem zweiten Schritt nachgewiesen. Die Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen waren aber noch nicht zufriedenstellend. Offenbar waren die viralen Antigene noch nicht ausreichend freigelegt. Daher schlossen sich an die Entparaffinierung noch weitere Schritte zur Demaskierung der antigenen Strukturen an. Dazu wurden die Gewebeschnitte 20 Minuten in Zitratpuffer gekocht und nach dem Abkühlen in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Gewebeproben noch 30 Minuten in einer Lösung aus PBS, Milchpulver und bovinem Serumalbumin inkubiert.

Der Nachweis MHV-68-spezifischer Antikörper in den Maussera gelang an viruspositiven BHK-21-Zellen. Verwendung von anti-Maus-IgG als Sekundärantikörper führte zu intensiver zytoplasmatischer und membranständiger Fluoreszenz an den virusinfizierten Zellen. Verdünnung des Serums führte erwartungsgemäß zu einer Signalabschwächung, bei einer Verdünnung von 1:2048 war Fluoreszenz nicht mehr nachweisbar. Entsprechend wurde eine Arbeitsverdünnung von 1:200 gewählt (Bilder 4/5).

Eine weitere Verbesserung der Ergebnisse brachte die Einführung eines Zwischenschrittes in Form eines nicht konjugierten Sekundärantikörpers, so dass erst in einem dritten Schritt fluoreszierende Antikörper eingesetzt wurden. In Leber, Lunge, Herz, Großhirn, Niere und Kleinhirn fand sich spezifische Färbung

ausschließlich in den Schnitten infizierter Tiere, deshalb kann man die Ergebnisse der Immunfluoreszenztests als verwertbar ansehen. Probleme bereiteten Milzen und Thymi, hier traten auch bei den Kontrolltieren unspezifische Signale auf. Daher wurden die entsprechenden Organschnitte nicht ausgewertet.

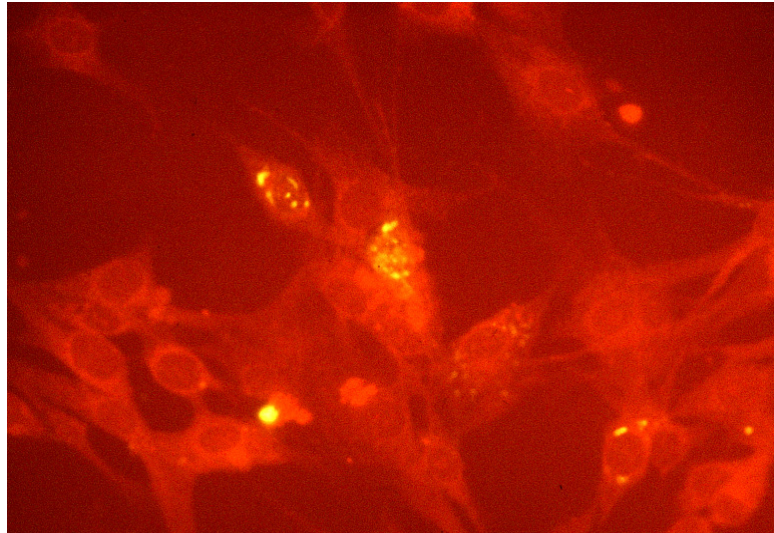


Abb. 4: BHK 21 Zellen inkubiert mit MHV-68-positivem Serum 1:1024

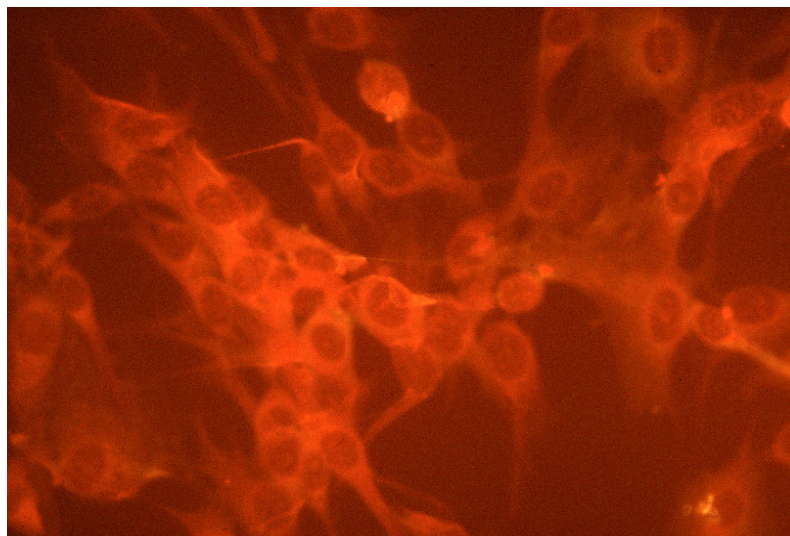


Abb. 5: BHK 21 inkubiert mit negativem Mausserum 1:50

4.1.4 Etablierung einer durch MHV-68-Infektion immortalisierten B-Zelllinie

Eine wichtige Aufgabe bestand darin, eine immortale, MHV-68-positive Zelllinie zu schaffen. Hierzu wurden Lymphozyten aus Milzen von infizierten Tieren isoliert. Nach der Kultivierung wurden die Zellen mit MHV-68 superinfiziert. Innerhalb von 24 Stunden kam es zur Clusterbildung. Im weiteren Verlauf proliferierten die Zellen im Cluster rasch.

Innerhalb von zwei Wochen ließ die Teilungsaktivität nach und die überwiegende Zahl der Zellen starb ab. Wenige Zellen blieben danach über einen Zeitraum von vier Wochen vital und wurden weiter kultiviert. Nach dieser Zeit setzte bei drei Kulturen ohne weitere Behandlung erneut Clusterbildung und Proliferation ein. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen war so groß, daß sie versuchsweise in einem RPMI Lymphozytenmedium, supplementiert mit 10 % FKS kultiviert wurden. Diese Veränderung der Bedingungen wurde gut toleriert.

Die Zellkulturen wurden erfolgreich auf DNA von Maus-GAPDH (ein mausspezifisches housekeeping-Protein) untersucht, um zu belegen, daß es sich um Mauszellen handelt (Abb. 6). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß die Zellen MHV-68 DNA (G 50 nested-PCR) enthielten. Im Überstand konnte in geringerer Menge ebenfalls Virus-DNA nachgewiesen werden (Abb. 7).

Mittels IFT konnten auch Virusantigene an bzw. in den Zellen dargestellt werden (Abb. 8/9). Nach etwa 50 erfolgreichen Passagen wurden von allen drei Klonen Zellen eingefroren, die restlichen Zellen werden inzwischen seit Jahren erfolgreich weiterkultiviert.

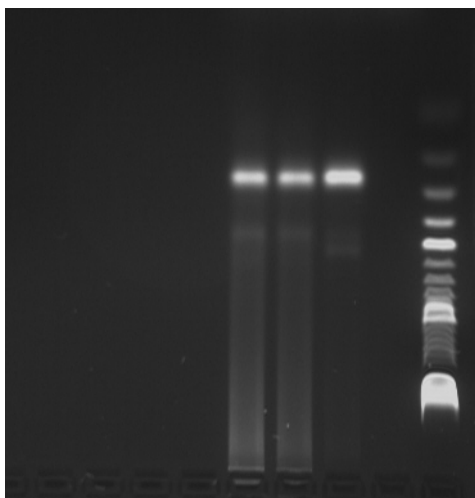


Abb. 6: Nachweis von muriner GAPDH (236 bp)

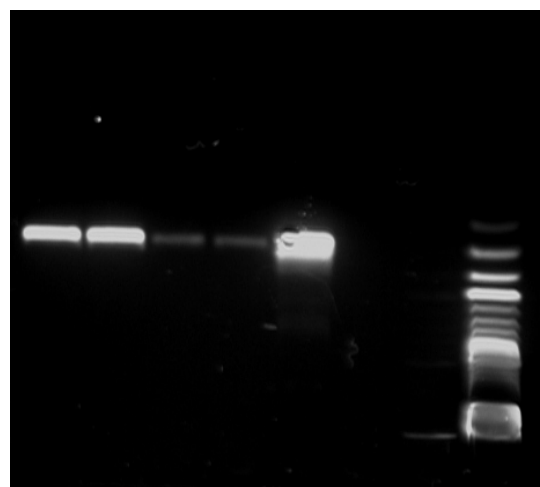


Abb. 7: Nachweis von G 50 Gen (293 bp) in B-Zelllinie

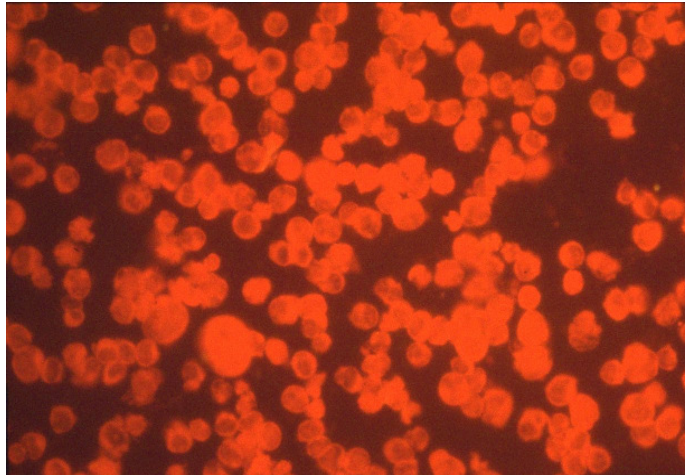


Abb. 8: MHV-68 positive Lymphozytenkultur inkubiert mit PBS

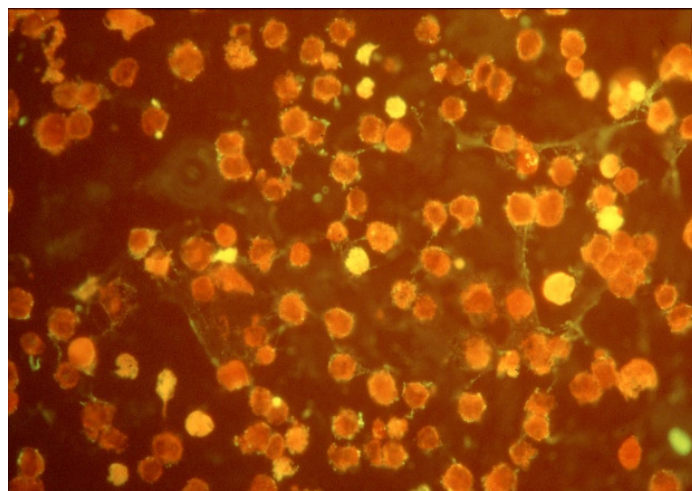


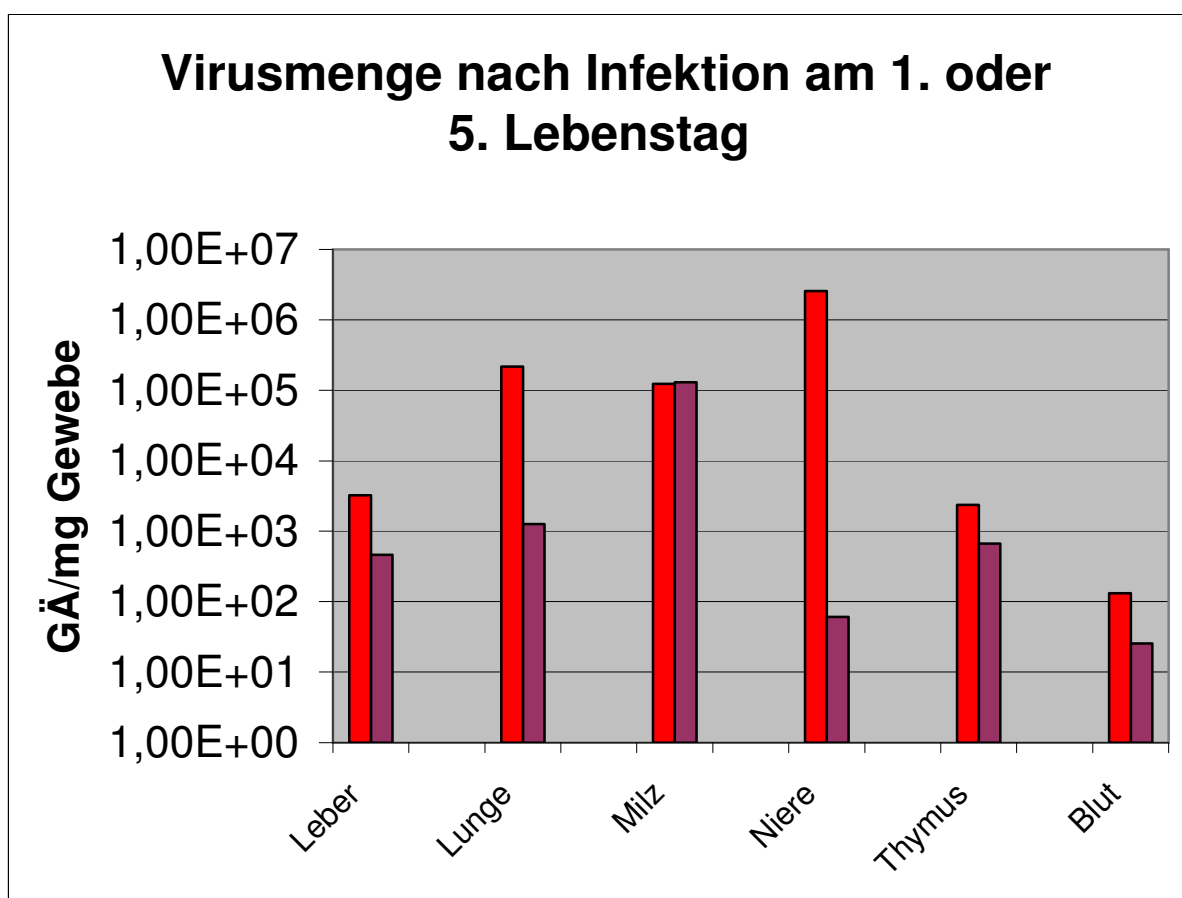
Abb. 9: MHV-68 positive Lymphozytenkultur inkubiert mit
MHV-68-Antikörper 1:64

4.2 Morbidität und Mortalität waren vom Alter bei Infektion abhängig

Grundlage dieser Arbeit sind im Wesentlichen drei Versuchsreihen mit insgesamt 95 Tieren. Davon wurden 39 Tiere neonatal (maximal 24 h nach Geburt) infiziert, 19 Tiere 4-6 Tage nach der Geburt und 17 Tiere 18-22 Tage nach der Geburt. 20 Tiere wurden nicht infiziert und als Kontrolltiere separiert gehalten. Die Tiere wurden eine, drei oder fünf Wochen nach Infektion getötet und präpariert. Alle Tiere wurden quantitativ auf Virus-DNA untersucht. Folgende Organe wurden bei allen Mäusen untersucht: Leber, Lunge, Milz, Niere, Thymus und Muskel. Die anderen Organe (Großhirn, Kleinhirn, Herz) wurden nur bei den Tieren der 3. Versuchsreihe untersucht. Blut konnte aus methodischen Gründen nicht bei allen Tieren entnommen werden.

Von den infizierten Tieren (n=75) waren 51 MHV-68-positiv; dies entspricht einer Infektionsrate von 73 %. Gefressene Tiere wurden hier nicht berücksichtigt. Sowohl Morbidität als auch Mortalität wurde nur bei den neonatal infizierten Tieren beobachtet. Fünf dieser Tiere wurden tot aufgefunden, acht sind von ihren Müttern gefressen worden und zwei mussten wegen deutlicher neurologischer Ausfälle vorzeitig entnommen werden.

Mit Ausnahme der Milz fanden sich bei dieser Population auch wesentlich höhere Virusmengen in den Organen. Diese waren bis zu vier Zehnerpotenzen größer als bei den Tieren, die zu einem späteren Zeitpunkt inokuliert wurden (Grafik I). Bei den verstorbenen Tieren fanden sich sehr hohe Virustiter in den Herzen, außerdem Myocardnekrosen. Möglicherweise waren diese die Todesursache. Bei zwei Tieren (beide neonatal infiziert) gab es auffällige Veränderungen der makroskopischen Morphologie, die Tiere waren dystroph und zeigten makroskopisch sichtbar einen Hydrozephalus.



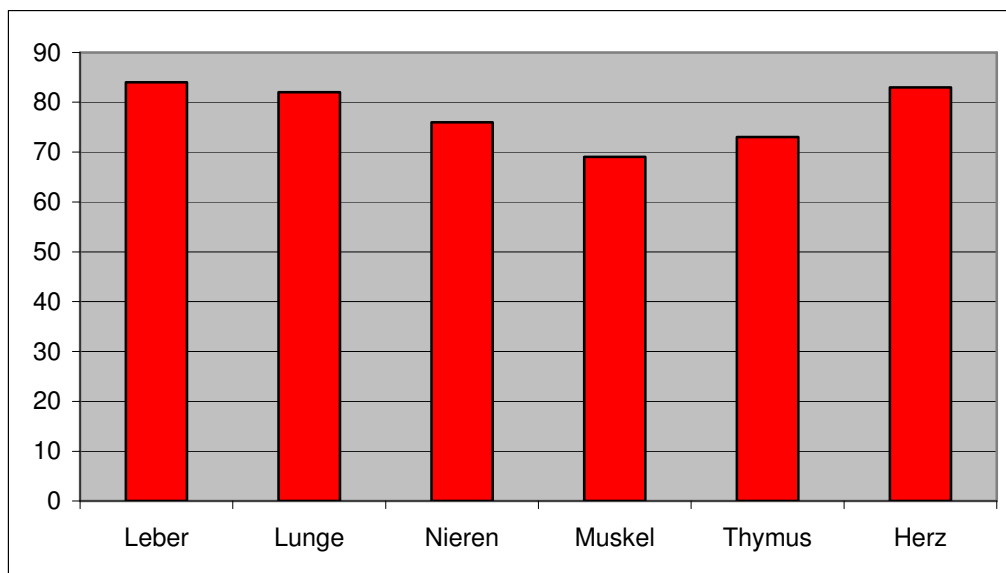
Grafik I: Tiere die am 1. Lebenstag infiziert wurden (rot), wiesen deutlich höhere Virusmengen auf. Im Blut fanden sich die geringsten Mengen an Virus-DNA (gezeigt sind die Medianwerte der jew. Population)

4.3 Nachweis von MHV-68 DNA in verschiedenen Organen

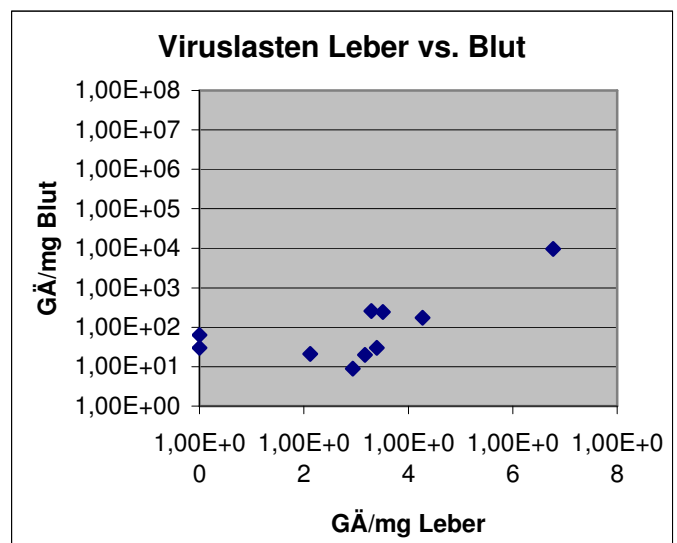
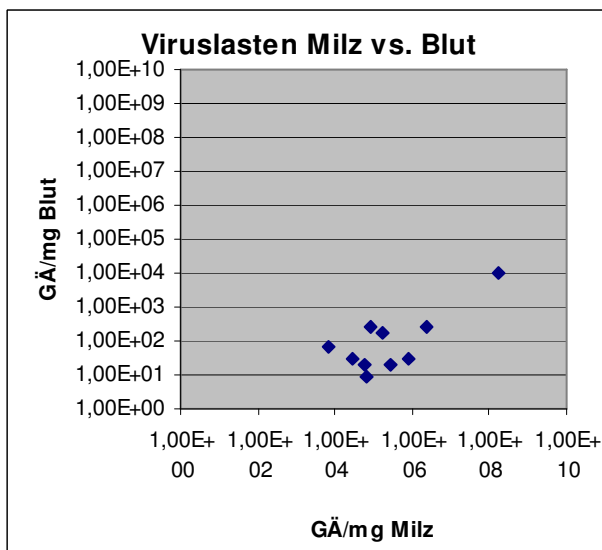
Ausgesuchte Organe wurden auf Virus-DNA untersucht, dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tiere, bei denen in mindestens einem Organ Virus-DNA nachgewiesen wurde, wurden als infiziert betrachtet. Dabei gelang der DNA-Nachweis in der Milz immer. Für alle übrigen Organe fanden sich die in Grafik II gezeigten Infektionsraten. Herzen (untersucht nur bei neonatalen Tieren) waren bei 83 % aller viruspositiven Tiere betroffen, häufig mit der größten Viruslast. Bei keinem der Kontrolltiere fand sich Virus-DNA in den verschiedenen Geweben. In den betroffenen Organen wird das Virus auch aktiv repliziert, wie Untersuchungen zur Transkriptionsaktivität zeigen (s.u.).

Um auszuschließen, dass Viruspartikel im Blut eine Infektion der Organe vortäuschen, wurden Virusmengen in den Organen und im Blut gegenübergestellt. Dabei zeigte sich jeweils eine wesentlich höhere Virusmenge in den Organen (Grafik III/IV).



Grafik II: Infektionsraten einzelner Organe bezogen auf erfolgreich infizierte Tiere (in Prozent)



Grafik III/IV: Direkter Vergleich der Virusmengen in Blut und in der Milz bzw. Leber für einzelne Tiere

4.4 Transkriptionsaktivität und Infektiosität von MHV-68

4.4.1 Nachweis auf RNA-Ebene

Der Nachweis von Virus-DNA im Gewebe allein ermöglicht noch keine Aussage darüber, ob das Virus auch replikationsaktiv ist. Deshalb wurden von einigen Tieren ausgewählte Organe auf Transkriptionsaktivität untersucht. Dafür wurde aus den Organen isolierte RNA verwendet, die in cDNA umgeschrieben wurde. Diese cDNA wurde mit Hilfe unterschiedlicher Primer auf Gene des lytischen Zyklus bzw. der latenten Phase untersucht. Über die Probleme der eindeutigen Zuordnung der Gene zu den Infektionsphasen wurde in der Einleitung berichtet.

Das Lebergewebe von sieben innerhalb der ersten 2 Wochen nach Infektion getöteten Tieren wurden auf Transkripte der Gene M2, M3, M7, G50 und ORF 59 untersucht. In jedem Organ fand sich mindestens eines dieser Transkripte, in den meisten Organen mehrere (Tabelle 4.1). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß in diesen Organen eine lytische Replikation stattfand.

Bei zwei Tieren die nach 5 Wochen getötet worden waren, wurden Milzen, Lebern, Lungen, Niere, Thymi und Muskeln auf Transkripte der Gene M 2, 3, 7, ORF 6, 25, 27, 57, 59 und G 50 untersucht. Dabei zeigte ein Tier (2/3-17) nur in Milz, Lunge und Niere Aktivität. Dies spricht für einen Übergang in die Latenz. Dabei wurden auch

Gene exprimiert, die eher dem lytischen Zyklus zugeordnet werden (M7, G50). Das andere Tier (2/3-18) zeigte in allen Organen ein breites Spektrum an Aktivität. Es bestand keine Präferenz für bestimmte Gene. Dieses Tier war zum Zeitpunkt der Organentnahme deutlich dystroph und hatte histologisch einen Hydrozephalus (Abb. 10). Diese ausgeprägte ubiquitäre Virusaktivität könnte Zeichen einer persistierenden aktiven Infektion sein.

Tabelle 4.1 Expression viraler Gene in verschiedenen Geweben

Primer Tier/Organ	G 50	M 2	M 3	M 7	ORF 6	ORF 25	ORF 27	ORF 57	ORF 59
2/3-17									
Milz	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Leber	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lunge	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Niere	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Thymus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muskel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2/3-18									
Milz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leber	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Lunge	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Niere	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thymus	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Muskel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber:									
3/1-2	-	-	-	-					+
3/1-3	+	+	+	+					+
3/2-4	+	+	+	+					+
3/4-6	-	+	+	+					+
3/1-8	-	-	-	+					+
3/1-10	+	+	+	+					+
3/5-18	+	+	+	+					+



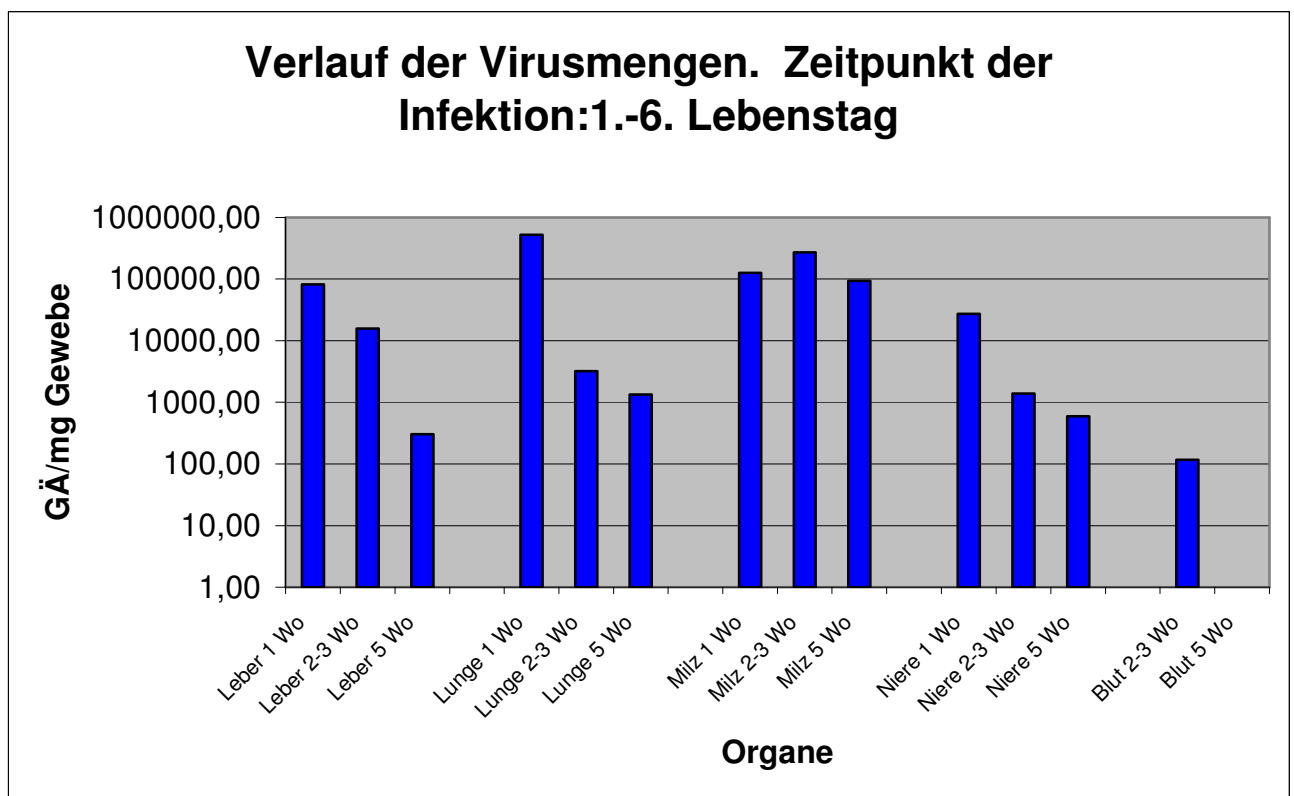
Abb. 10: Maus 2/3-18 im Vergleich mit gleich alten Kontrolltieren

4.4.2 Direkter Nachweis von Virionen mittels des zytopathischen Effekts

Für den Nachweis infektiöser Virionen wurden verschiedene Verdünnungsstufen homogenisierter Organe (Leber, Lunge, Milz) auf BHK-21 Zellen inkubiert. Bei 2 Tieren (2/2-10, 3/7-24), die 24 und 32 Tage nach Infektion getötet wurden ließ sich kein Virus rekultivieren. Bei 2 Tieren (3/2-4 und 3/2-8), die 9 Tage nach Infektion getötet wurden, war dies möglich. Bei diesen Tieren wurden aus Leber- und Milzgewebe sowie aus dem Großhirn infektiöse Virionen rekultiviert.

Dies stimmt mit dem bekannten Modell überein, nach dem die Infektion nach 10-14 Tagen ein Maximum erreicht. Hier kann Virus isoliert werden. Danach geht MHV-68 in die Latenz über und MHV-68 ist nicht mehr direkt anzuzüchten.

4.5 Verlauf der Virusmengen



Grafik V: Deutlich zu erkennen der Abfall der Virusmengen um teilweise über 2 Zehnerpotenzen nach 5 Wochen

In der ersten Woche nach Infektion fanden sich die größten Virusmengen in der Lunge. Bei allen untersuchten Organen fiel die Viruslast mit der Zeit steil ab, während

sie in der Milz stabil blieb. Das bestätigt die Bedeutung der Milz für die latente Infektion. Die anderen untersuchten Organe waren regelmäßig mit betroffen, über die Kontamination mit Viren im Blut hinaus. Dies war besonders deutlich bei den sehr früh infizierten (1.-6. Lebenstag) Tieren.

4.6 Nachweis von Virusantigen in peripheren Geweben

Nach entsprechender Vorbehandlung (siehe 3.13) wurden die Organschnitte der Tiere mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert. Es zeigte sich, daß die Nachweisgrenze für Virusantigene bei dieser Methode recht hoch liegt, d.h. nur bei Tieren mit hohen Virusmengen gelang der Nachweis von Fluoreszenz, wie Tabelle 4.2 zeigt. Insgesamt konnte ab etwa 10^5 GÄ/ mg Gewebe Antigen nachgewiesen werden. Besonders eindrucksvolle Ergebnisse wurden bei Leber, Lunge und Hirn erzielt.

Bei den Lebern wurden generell Hepatozyten angefärbt, und zwar einzeln oder in Gruppen über den ganzen Schnitt verteilt, allerdings mit Betonung der perivaskulären Zonen (Abb. 11). Insgesamt fanden sich 4 positive Leberschnitte in 9 PCR-positiven Versuchstieren, keine in den Kontrollen, allerdings 1 pos. Leber in einem PCR-negativen Versuchstier. Die Nieren boten eher unscharf begrenzte Zonen der Fluoreszenz, teilweise schienen Tubuluszellen betroffen, teilweise das Tubulolumen (Abb. 12). Hier waren 4 von 9 Organen positiv, 3 davon übereinstimmend mit dem Leberbefund. In den Kontrollen und negativen Versuchstieren fand sich nichts. Anders als erwartet zeigte sich Fluoreszenz in den Lungen vorwiegend peribronchiolär und interstitiell (Abb. 13), nicht in Alveolarzellen. Insgesamt waren 3 von 9 untersuchten Organen positiv, alle parallel zum Leberbefund, keine der Kontrollen.

Herzen waren 2 positiv, hier fand sich zusätzlich ein positiver Befund bei einem PCR-negativen Tier (dieses Tier zeigte auch den pos. Leberbefund).

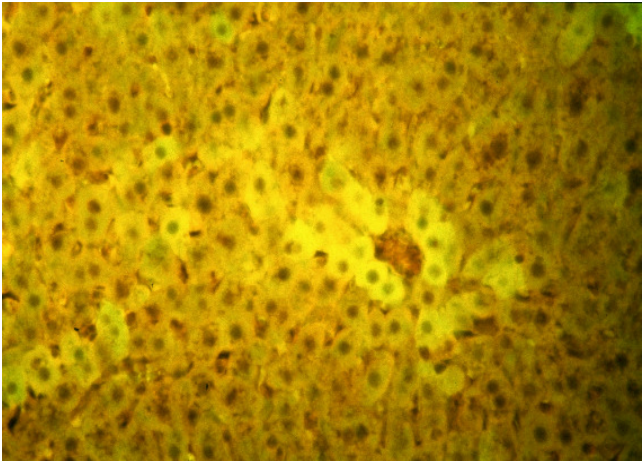


Abb. 11 a: MHV-68-positive Hepatozyten perivaskulär
Tieres

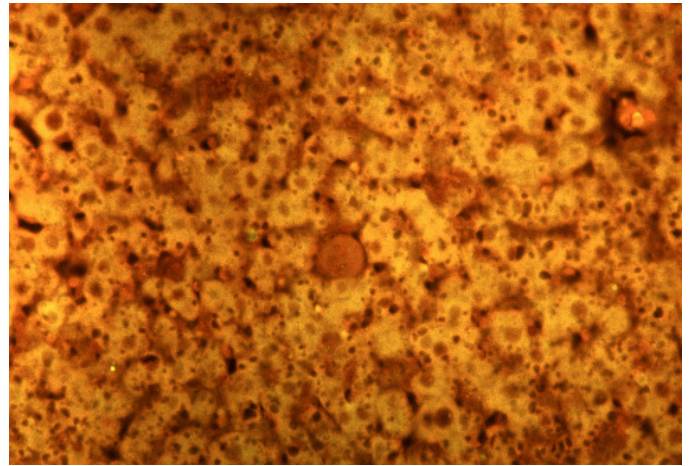


Abb. 11b: Leberbefund eines nicht infizierten
Tieres

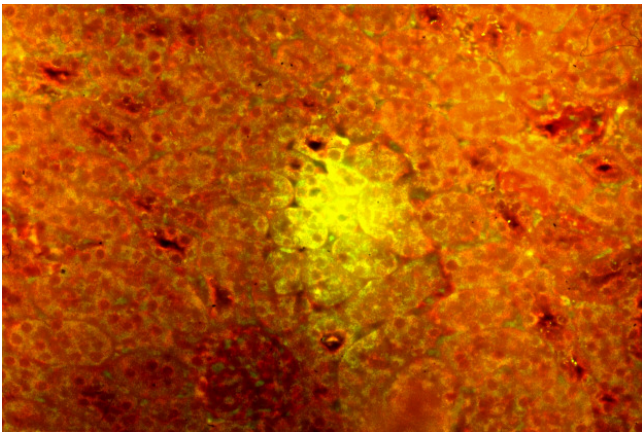


Abb. 12 a: MHV-68-positive Nierentubuli

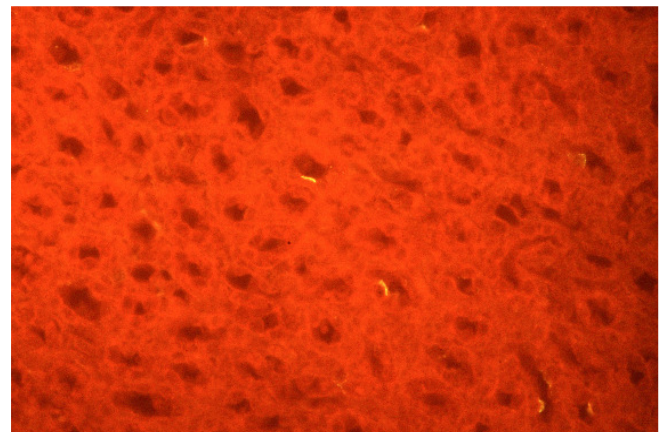


Abb. 12b: Nierenbefund eines Kontrolltieres

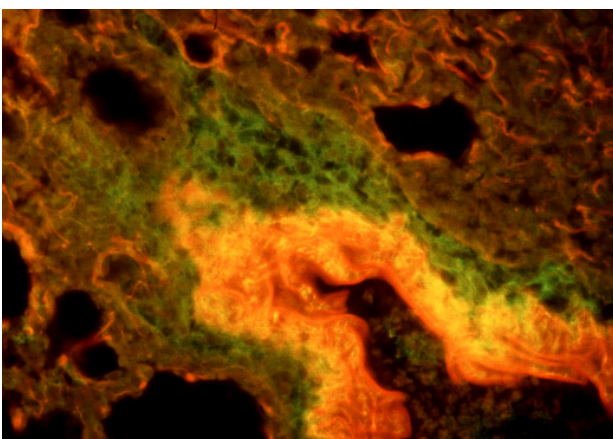


Abb. 13 a: Peribronchiolärer Nachweis von MHV-68

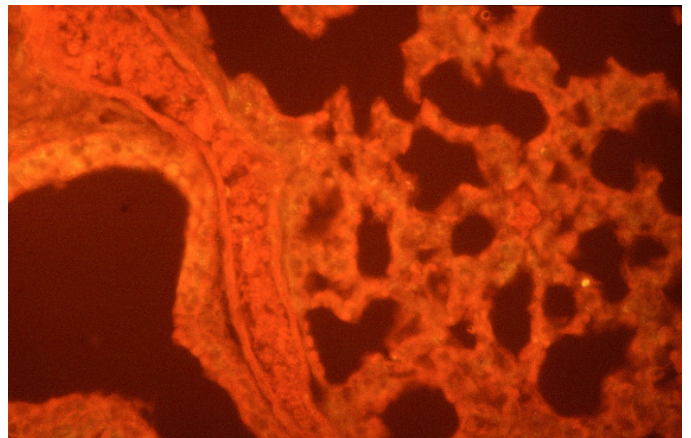


Abb. 13b: Lunge Kontrolltier

Tabelle 4.2 Korrelation von Virusmenge und immunologischem Nachweis mittels Immunfluoreszenz

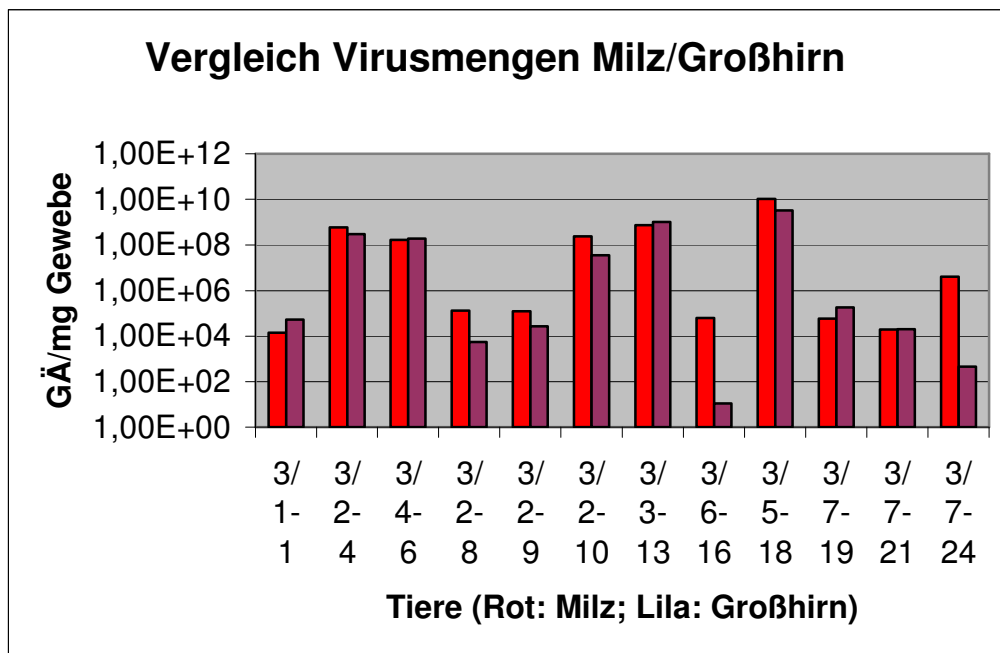
Tier	Leber IFT	GÄ/mg Gewebe	Niere mg IFT Gewebe	GÄ/ mg Gewebe	Lunge IFT	GÄ/ mg Gewebe
3/2-4	+	8,29*10E8	+	5,85*10E8	+	1,56*10E9
3/7-24	+	8,5*10E5	+	5,84*10E5	-	7,11*10E3
2/3-18	+	3,26*10E6	+	1,8*10E8	+	2,16*10E5
2/1-8	-	3,27*10E6	+	2,17*10E6	-	5,21*10E5
1/2-8	-	1,39*10E2	-	2,35*10E2	-	5,42*10E2
1/2-6	-	3,9*10E1	-	5,23*10E2	-	9,5*10E2
1/12	+	1,1*10E5	-	2,36*10E3	+	2,98*10E6
3/1-2	-	8,03*10E2	-	1,07*10E4	-	2,36*10E3
2/3-21	-	9,4*10E1	-	0,0	-	1,77*10E2
PCR-negative Tiere						
1/2-2	-	0,0	-	0,0	-	0,0
1/2-7	-	0,0	-	0,0	-	0,0
Kontrolltiere						
1/2-15	-	0,0	-	0,0	-	0,0
2/3-42	-	0,0	-	0,0	-	0,0

4.7 ZNS-Infektion nach nasaler Inokulation

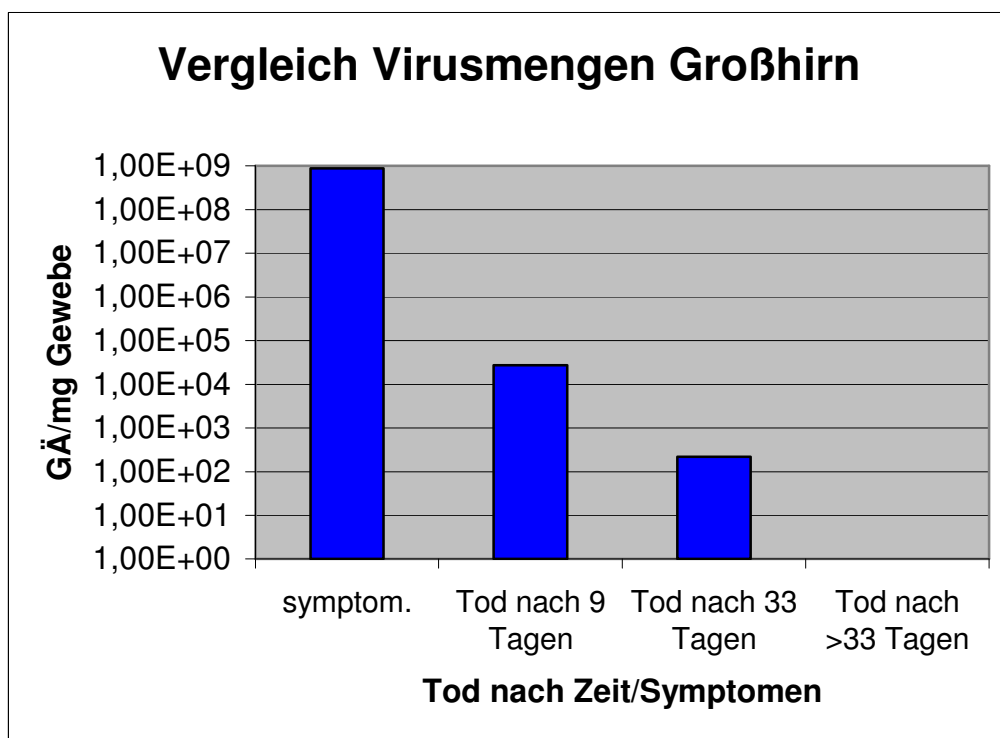
4.7.1 Nachweis von Virus-DNA im ZNS

Von Tieren, die neonatal infiziert worden waren, stand Hirngewebe für die DNA-Analyse zur Verfügung. Bei den untersuchten Mäusen fand sich bei 24 von 29 (83 Prozent) erfolgreich infizierten Tieren Virus-DNA im Gehirn. Es zeigte sich eine deutliche Beziehung zwischen der Viruslast in den Organen und im Hirn (bis auf wenige Ausnahmen waren Großhirn und Kleinhirn gleichermaßen befallen), gezeigt hier am Beispiel Milz (Grafik VI).

Die Ergebnisse der DNA-Analyse stimmen gut mit den histologisch/pathologischen Daten (erhoben von Frau Evelyn Alberg) überein. D.h. Entzündungsreaktionen fanden sich fast ausschließlich in PCR-positiven Hirnen. Während die Entzündungsreaktion in den Geweben mit der Zeit zunahm, nahm die Viruslast ab. Die Viruslasten in den Hirnen (gezeigt für Großhirne, gilt gleichermaßen für Kleinhirne) nahmen mit zunehmendem zeitlichen Abstand von der Infektion stetig ab. Tiere, die tot oder wegen auffälliger Symptome vorzeitig entnommen werden mussten (hier kurz symptomatisch genannt) zeigten die größten Viruslasten (Grafik VII).



Grafik VI: Deutliche Korrelation zwischen den Virusmengen



Grafik VII: Abnehmende Virusmengen im Großhirn (Median)

4.7.2 Nachweis von Virusantigenen im ZNS

Mittels Immunfluoreszenztest wurden Virusantigene im ZNS nachgewiesen. Die Nachweisgrenze lag, bezogen auf die Virumenge bei etwa 10^5 GÄ/mg Gewebe

(Tabelle 4.2). Es wurden Gewebeschnitte von zwei Kontrolltieren, von drei Tieren, bei denen in keinem der untersuchten Gewebe Virus mittels PCR detektiert wurde, und von acht infizierten Tieren untersucht. Hierbei wurden im ZNS 3 Regionen gesondert betrachtet: der Cortex, der Hippocampus und das Kleinhirn. Kein Schnitt von Kontrolltieren bzw. PCR-negativen Tieren zeigte eine spezifische Fluoreszenz. Dagegen zeigten alle hier untersuchten PCR-positiven Tiere Leukozyteninfiltrate in der Immunhistochemie. Bei vier dieser Tiere fanden sich auch positive Ergebnisse bei den Immunfluoreszenztests:

1. Tier 2/3-18: (neonatal infiziert, getötet nach 5 Wochen) Die Histologie zeigte erweiterte Ventrikel mit periventrikulären Infiltraten. Diesem Befund entsprechend fand sich im IFT Fluoreszenz an Ependymzellen und an Zellen des Plexus Choroideus des 4. Ventrikels.
2. Tier 3/2-4: (neonatal infiziert, Tod nach 10 Tagen) Die Histologie zeigte eine Meningitis und eine diffuse Enzephalitis. Der IFT zeigte diffuse plasmatische Fluoreszenz von kortikalen und subkortikalen Zellen.
3. Tier 3/4-6: (neonatal infiziert, nach 16 Tagen wegen Ataxie vorzeitig entnommen) Die Histologie zeigte eine diffuse Enzephalitis und Zerebellitis. Fluoreszenz fand sich sowohl im Ammonshorn, als auch im Kleinhirn.
4. Tier 3/3-12: (neonatal infiziert, nach 10 Tagen tot aufgefunden) Die Histologie zeigte eine diffuse Enzephalitis und ein Infiltrat im Temporallappen. Die Immunfluoreszenz zeigte Fluoreszenz von Zellen des Hippocampus und kortikaler Neurone.

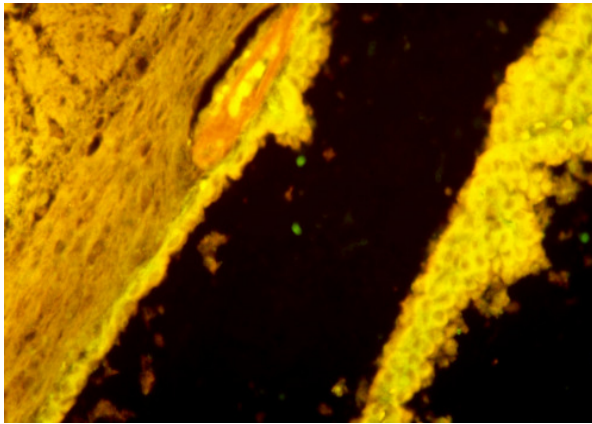


Abb. 14: Tier 2/3-18 Plexus choroideus

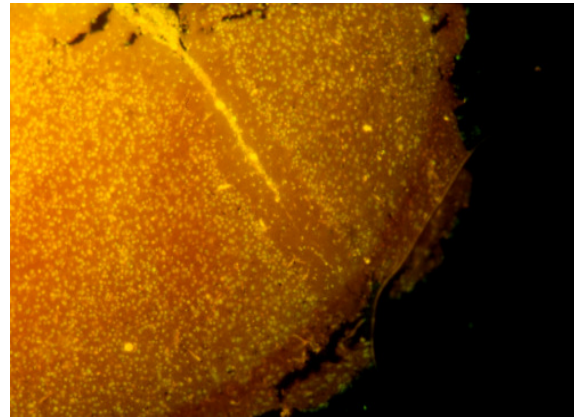


Abb. 15: Tier 3/2-4: Großhirnrinde

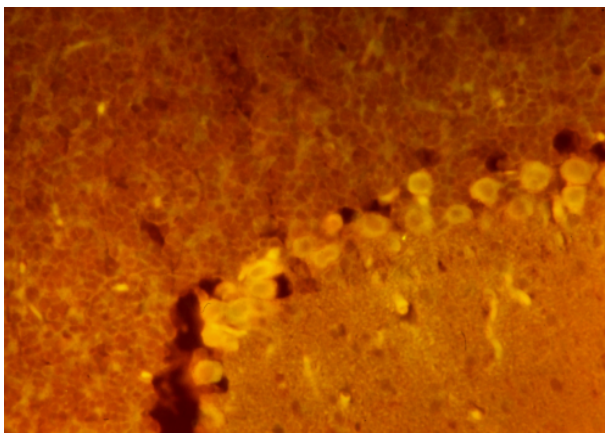


Abb 16: Tier 3/4-6 Kleinhirn

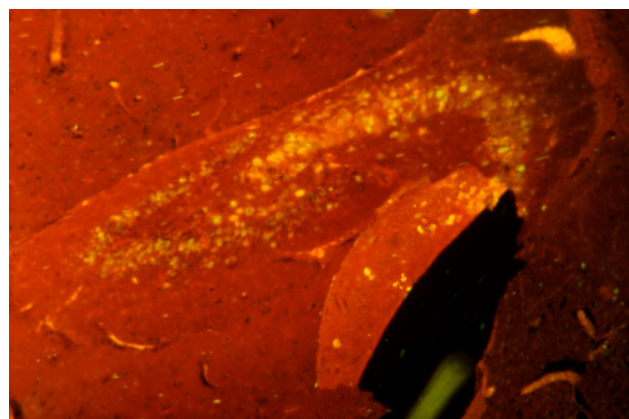
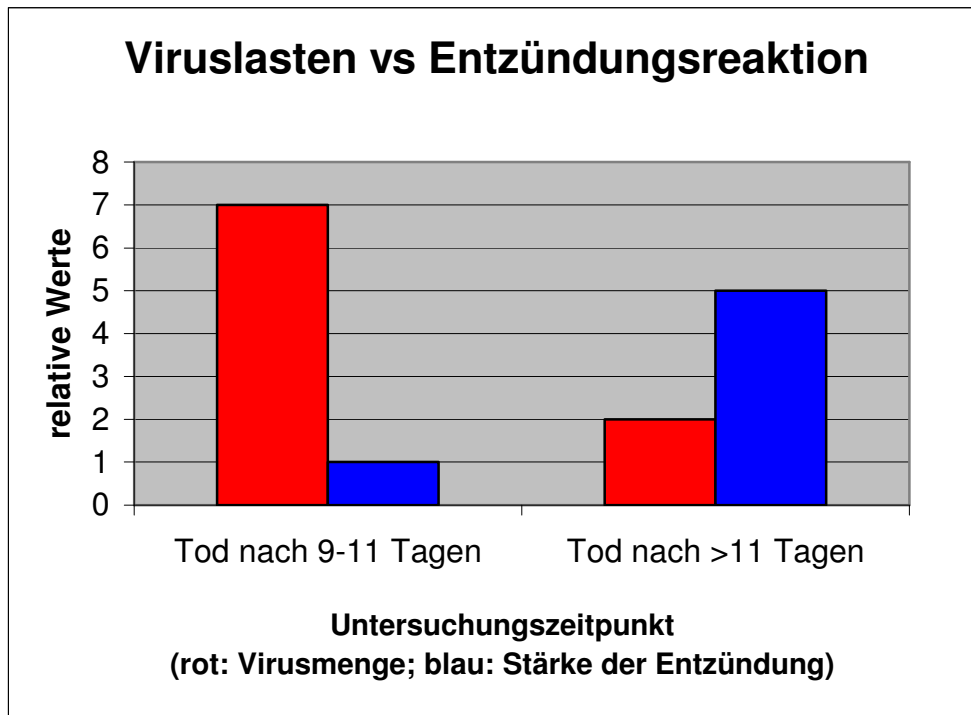


Abb. 17: Tier 3/3-12 Ammonshorn

4.7.3 Vergleich virologischer und immunhistochemischer Befunde

Wie oben bereits erwähnt, wurden die Tiere parallel histologisch und immunhistochemisch auf Entzündungsreaktionen hin untersucht (Details siehe Arbeit von Frau Evelyn Alberg). Verglichen wurden die Daten für die Hirne der 3. Versuchsreihe.

Bei vielen Tieren, die neonatal infiziert und zwischen dem 6. und 10. Lebenstag getötet wurden, fanden sich keine Entzündungszeichen, jedoch hohe Virusmengen (10^8 bis 10^{10} GÄ/mg Gewebe) in den Gehirnen. Zu späteren Zeitpunkten getötete Tiere wiesen niedrigere Virusmengen auf (10^2 bis 10^5 GÄ/mg Gewebe), dagegen zeigte sich eine deutliche Entzündungsreaktion (Grafik VIII).



Grafik VIII: Viruslast und Entzündungsreaktion verhalten sich gegenläufig

An ausgewählten Tieren wurden benachbarte histopathologische Schnitte sowohl auf CD 45 (T-Zellen) als auch Virusantigen (IFT) untersucht. Dabei ergaben sich deutliche Übereinstimmungen der betroffenen Bereiche (Bilder 18-21). Hier konnte ein räumlicher Zusammenhang zwischen Infektion und Immunreaktion hergestellt werden.

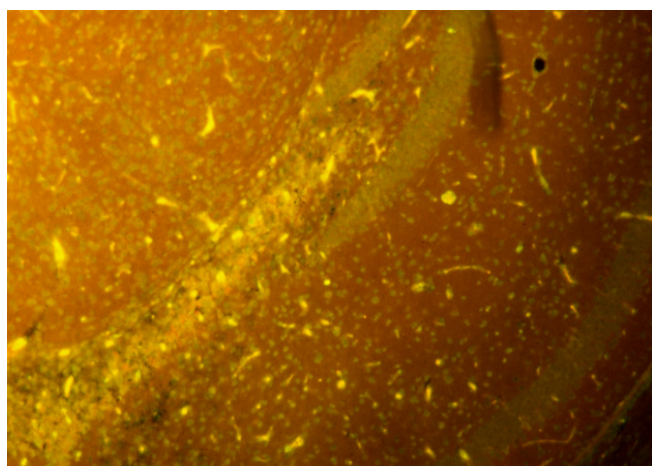
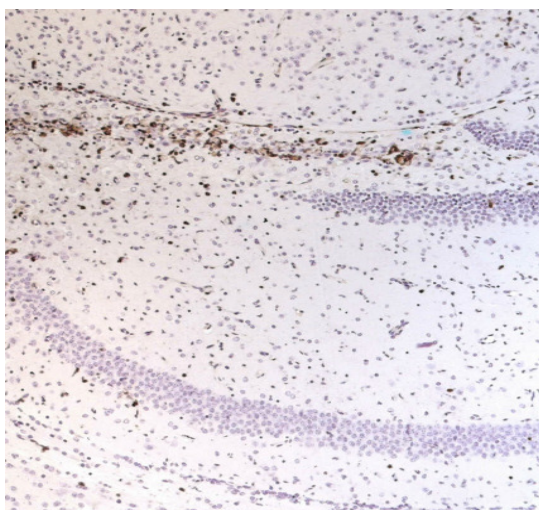


Abb. 18 a: Tier 3/4-6 Temporallappen CD-45 Färbung Abb. 18 b: Tier 3/4-6 MHV-68-IFT

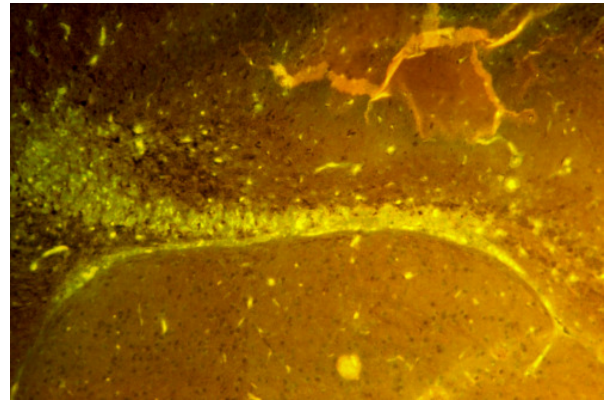
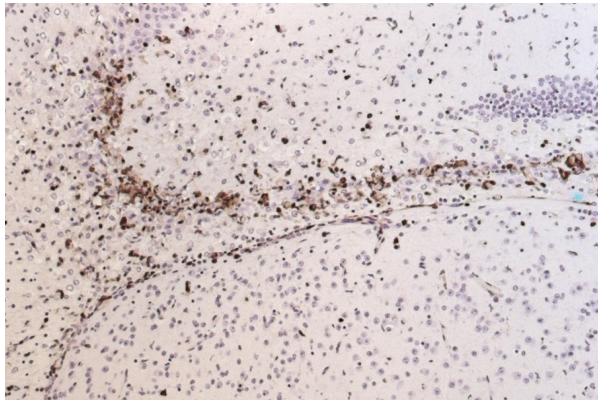


Abb. 19 a: Tier 3/4-6 Temporalregion CD 45 Färbung Abb. 19b: Tier 3/4-6 IFT gleiche Region

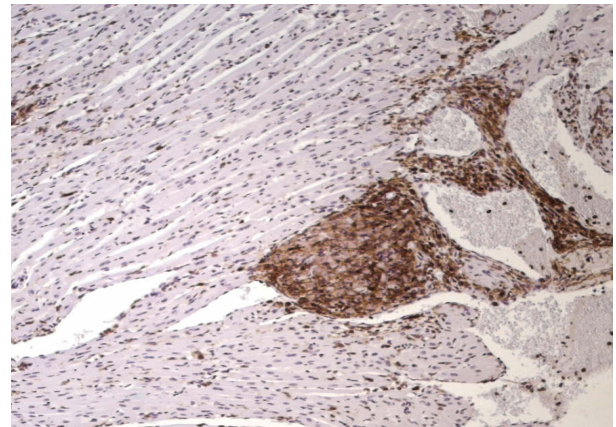
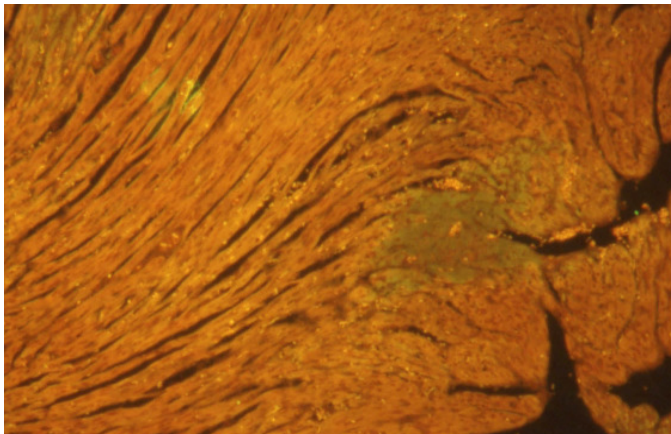


Abb. 20 a: Tier 3/4-6 Herzmuskel mit MHV-68-Nachweis Abb. 20b: Tier 3/4-6 Herzmuskelnekrose

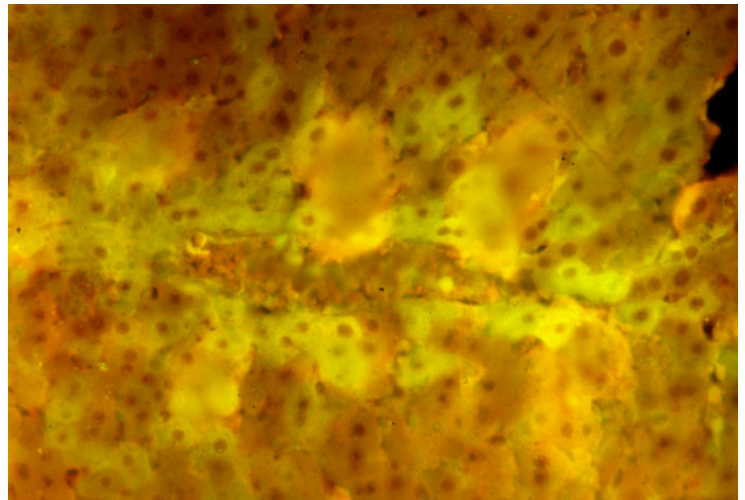
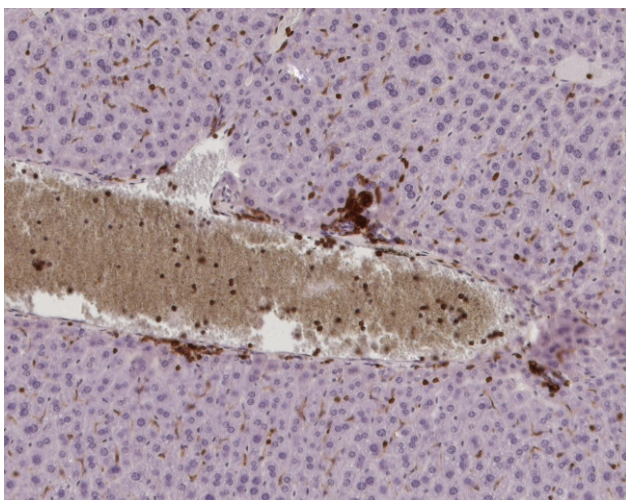


Abb. 21 a: perivaskuläre Infiltrate in der Leber Abb. 21b: perivaskulär infizierte Hepatozyten im IFT

5 Diskussion

Die MHV-68-Infektion der Maus gleicht im Ablauf und im klinischen Verlauf der EBV-Infektion des Menschen. Ziel dieser Arbeit war es, das bestehende Maus-Modell zu erweitern und den Ablauf der Infektion im ZNS darzustellen. Mit der Einführung einer Real-Time-PCR für das G-50-Gen ist es erstmals möglich MHV-68-DNA quantitativ im Gewebe nachzuweisen und quantitative Aussagen über den Verlauf der Infektion in Organen und Geweben zu machen. Der Nachweis der viralen Gene M 2, 3, 7, ORF 25, 57, 59 und des Gens 50 wurden etabliert; das macht den qualitativen Nachweis für diese Gene sowohl auf DNA als auch auf RNA-Ebene möglich.

Der Nachweis viraler Antigene im Gewebe gelang mittels spezifischer Antikörper; so konnte das Virus in den Organen lokalisiert werden. Das Vorkommen des Virus im Gewebe wurde mit immunhistochemischen Daten zur Verteilung von Entzündungszeichen verglichen. Mittels Zellkulturtechniken wurde infektiöses Virus im Gewebe der infizierten Mäuse nachgewiesen.

Über die Atemwege gelangt MHV-68 normalerweise in den Organismus und führt zu einer aktiven Infektion der Lunge, die etwa 10-14 Tage anhält. Es entwickelt sich eine Virämie mit Befall verschiedener Organe, wie Leber, Niere und Herz. In B-Lymphozyten entwickelt das Virus ein latentes Stadium. In den B-Lymphozyten ist die Virus-DNA lebenslang nachweisbar, in anderen Organen sinkt die Virusmenge nach 10-14 Tagen rasch bis unter die Nachweisgrenze ab.

5.1 Die peripheren Organe im Verlauf der Infektion

Der Virusnachweis in den peripheren Organen diente in erster Linie zur Erprobung der neu entwickelten Methoden, dabei wurden die Daten, die an dem Bekannten Modell erhoben wurden, teilweise bestätigt. Allerdings ergaben sich auch neue Aspekte.

Die Virusreplikation findet offenbar nicht nur in der Lunge und dem lymphatischen System sondern auch in anderen Organen in größerem Ausmaß statt. Vor allem ist die Leber betroffen. Die Anwesenheit von Virionen im Lebergewebe unterstreicht dies. Die Anfärbung von Hepatozyten im IFT zeigt, dass hier Parenchymzellen Ziel der Virionen sind und nicht etwa Zellen des Immunsystems oder des Interstitiums. Bislang waren lediglich MHV-68 Virionen mittels Zellkultur und ihre DNA mittels nested PCR im Lebergewebe nachgewiesen worden (Blaskovic et al. 1984, Flaño et

al. 2003, Sunil-Chandra et al. 1992). Die von mir durchgeführte Quantifizierung der viralen DNA und der Nachweis von Transkriptionsaktivität in der Leber sind neue Erkenntnisse.

Die Nieren sind in der Regel mitbetroffen, bei einigen Tieren findet sich in ihnen sogar die höchste Virusmenge. Die Frage, ob hier eine aktive Replikation des Virus stattfindet, kann aufgrund der bisher erhobenen Daten nicht eindeutig beantwortet werden. In Anbetracht der teilweise sehr hohen Viruslasten ist dies aber wahrscheinlich. Möglicherweise werden die Virionen auch renal ausgeschieden (Abb. 12). Dafür spricht der Nachweis viraler Antigene in Tubulusepithelien (Rajcani et al. 1985).

Eine Beteiligung des Herzens im Sinne einer Myokarditis war bei den vorzeitig verstorbenen Tieren unter Umständen die Todesursache. Die Untersuchten Mäuse dieses Kollektivs hatten Viruslasten von etwa 10^9 GÄ/mg Gewebe im Herzgewebe, was auch meist dem höchsten Wert bei dem entsprechenden Individuum entsprach. Bei vier Tieren (3/4-6, 3/3-12, 3/3-13 und 3/5-18) wurde histologisch eine Herzmuskelnekrose gesichert und bei Tier 3/4-6 gleichzeitig Virusantigen im Bereich der Nekrose nachgewiesen. Bei einem anderen Versuchstier (3/1-1) wurde Transkriptionsaktivität für Gene des lytischen Zyklus im Herzen nachgewiesen. Andere Autoren hatten bisher nur den Nachweis von Virionen in der Herzmuskulatur erbracht, genauere Daten lagen nicht vor (Blaskovic et al. 1984, Rajcani et al. 1985). Die Lokalisation von Virusantigen in der Lunge weicht von den bisherigen Erkenntnissen deutlich ab. Bei den hier untersuchten Tieren war virales Antigen peribronchiolär nachweisbar, nicht in Alveolarepithelzellen, wie vermutet. Möglicherweise war die Ursache auch hier die hohe Nachweisschwelle bei der angewandten Methode. Es ist allerdings bekannt, daß MHV-68 bei Mäusen eine Bronchiolitis verursacht (Nash et al. 2001).

5.2 Natürliche Infektion des ZNS

Eine Infektion neuronaler Zellen durch MHV-68 wurde bereits früh beschrieben. Im Jahre 1980 wurde das Virus durch Hirnpassage an neugeborenen Mäusen isoliert (Blaskovic et al. 1980). Allerdings existierte bislang kein Tiermodell für eine MHV-68 Infektion des ZNS auf natürlichem Wege.

MHV-68 DNA wurde im Hirn einer adulten C57BL/6J Maus 60 Tage nach Infektion gefunden (Flaño et al. 2003). Ebenso gelang es MHV-68 in Neuronen des

Hippocampus, Bergmannschen Gliazellen, meningealen Zellen und ependymalen Zellen zu identifizieren. Dies gelang jedoch nur nach intrathekaler Applikation der Virionen, oder nach Infektion Interferonrezeptor-negativer Tiere (Terry et al. 2000). Eine Infektion des ZNS nach intranasaler Inokulation von sieben Tage alten Wildtyp-Mäusen gelang nicht. Im Rahmen unseres Projektes wurde der Versuch unternommen, eine Infektion des ZNS mit MHV-68 an Wildtyp-Mäusen zu erreichen. Diese Aufgabe wurde erfüllt. Die Untersuchungen belegen zweifelsfrei eine Infektion des ZNS neugeborener Tiere. Die Infektion kam auf physiologischem Weg, über die nasale Aufnahme der Virionen, zustande. Großhirn und Kleinhirn waren gleichermaßen von der Infektion betroffen. Entsprechend konnten in einer anderen Arbeitsgruppe Entzündungsreaktionen im Hirn mittels CD 45 Marker (T-Zellmarker) nachgewiesen werden, hier auch vereinzelt bei älteren Tieren.

5.3 Zeitlicher Verlauf von Infektion und Immunabwehr

Das Virus etabliert sich sehr wahrscheinlich im Verlauf der Infektion früh im ZNS. Bereits sieben Tage nach der Infektion ist virale DNA in verschiedenen Arealen des ZNS nachweisbar. Eine immunhistochemisch darstellbare Abwehrreaktion war zu diesem Zeitpunkt bei den meisten Tieren noch nicht vorhanden. Mit zunehmender Immunreaktion nahm die Viruslast im ZNS ab.

Zeichen einer effektiven Virusclearance finden sich frühestens nach 10-14 Tagen. Vorher ließen sich kaum Entzündungsreaktionen im ZNS nachweisen. Das späte Einwandern von Lymphozyten ist einerseits auf das unreife Immunsystem zurückzuführen, andererseits auf die Fähigkeit des Virus, durch das chemokinbindende Protein M 3 die Chemotaxis zu behindern (Jensen et al. 2003).

Zwei von 95 Tieren (2,1 Prozent) blieben in der körperlichen Entwicklung sichtbar zurück. Diese Tiere wiesen auch 5 Wochen nach Infektion noch in allen Organen überdurchschnittlich hohe Viruslasten auf. Bei einem der Tiere (2/3-18) wurde eine hohe Transkriptionsaktivität nachgewiesen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass hier ein Übergang in die Latenz nicht stattgefunden hat, sondern eine aktive, persistierende Infektion besteht. Möglicherweise handelt es sich um eine anerge Abwehrlage, da weder die Infektion ausreichend kontrolliert werden konnte, noch der Organismus durch das Immunsystem letal geschädigt wurde. Dies ist vermutlich kein seltenes Ereignis. Unter den neonatal infizierten Tieren (39) stellt diese Gruppe immerhin 5,1 % der Mäuse.

5.4 Ort der Infektion und Replikation

Von besonderem Interesse war die Lokalisation des MHV-68 im ZNS. Zielorte scheinen vor allem die Temporalregion, die Meningen, der Periventrikularraum und perivaskuläre Zonen im Großhirn zu sein. Diese Regionen wurden sowohl mittels Antigennachweis (IFT) direkt, als auch indirekt über Nachweis von Entzündungsreaktionen (siehe Arbeit von Frau Evelyn Alberg, Institut für Neuropathologie) ausgemacht.

Der Nachweis von MHV-68 in anderen Strukturen des ZNS – in 4 von 5 untersuchten Rückenmarksproben und bei 2 von 2 untersuchten Augen fand sich Virus-DNA – spricht für das Vorliegen von Virionen im Liquor. Ob in diesen Strukturen möglicherweise auch eine Virusvermehrung erfolgt, oder ob die Gewebeproben aufgrund ihres Liquorgehaltes positiv getestet wurden, kann nicht endgültig beantwortet werden.

Die Häufigkeit der ZNS-Beteiligung scheint vor allem vom Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion abzuhängen. Je jünger die Tiere sind, desto häufiger ist das ZNS betroffen. Dabei spielen wahrscheinlich zwei Faktoren eine wichtige Rolle. Einerseits fehlt den jungen Tieren noch eine effektive Immunabwehr, was die Infektion wesentlich aggressiver verlaufen lässt, dafür spricht auch die hohe Letalität in der entsprechenden Population. Die Folge sind wesentlich höhere Viruslasten im Organismus, und diese wiederum erleichtern einen Übergang ins ZNS. Andererseits ist die Blut-Hirnschranke wie auch das Immunsystem noch unausgereift, und damit leichter zu überwinden.

Die Möglichkeit für das Virus über neuronale Strukturen in das ZNS einzudringen erscheint gegenwärtig nicht sehr wahrscheinlich. Sowohl die Lokalisation der Viren als auch der Entzündungsreaktionen (Hippocampus, Ependym, Meningen, corticale weiße Substanz usw.) sprechen für eine Infiltration der Hirnstrukturen von den Blutgefäßen aus.

5.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine ausgeprägte Beteiligung des ZNS nach Infektion von Maus-Neonaten mit MHV-68. Es gibt Anhaltspunkte für die Lokalisation der Viren im Gehirn. Damit besteht die Möglichkeit, die Aktivitäten des Virus im ZNS genauer zu untersuchen. Die Reaktivierungsvorgänge des Virus können jetzt an der neu etablierten MHV-68 positiven B-Zelllinie dargestellt werden.

Erkenntnisse über die Reaktivierung des Virus und sein Verhalten im Wirt helfen, Strategien zur Entwicklung eines Impfschutzes gegen EBV zu finden.

6 Zusammenfassung

Eine schwerwiegende Komplikation der Epstein-Barr-Virus-Infektion im Kindesalter ist der Befall des zentralen Nervensystems (ZNS), mit Folgen wie z.B. Epilepsien und Enzephalitiden. Das gut etablierte Modell des dem EBV verwandten Maus-Herpesvirus 68 (MHV-68), war bisher nicht für Infektionen des ZNS anwendbar, da Infektionen auf natürlichem Wege nicht möglich waren.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Strategie zu finden, die eine MHV-68-Infektion des ZNS ermöglichte. Darüber hinaus war eine stabile, MHV-68-permissive Zelllinie zu entwickeln, die für in-vitro-Untersuchungen geeignet ist. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- die Infektion des ZNS gelang nach intranasaler Applikation des MHV-68; der Infektionserfolg wurde mittels quantitativem Nachweises viraler DNA im ZNS und anderer Organe erbracht;
- der Nachweis viraler Antigene im ZNS und anderen Organen gelang mittels Immunfluoreszenz;
- das Virus wurde aus Gewebe angezüchtet;
- die geeignete Infektiosdosis wurde ermittelt;
- das Virus wurde im ZNS lokalisiert;
- der Nachweis viraler m-RNA in Geweben als Ausdruck von Replikationsaktivität war möglich;
- infektiöse Viruspartikel wurden in verschiedenen Geweben nachgewiesen;
- es ist gelungen, eine permanent wachsende, MHV-68-positive B-Zelllinie zu etablieren.

Es ist gelungen, das bekannte MHV-68-Modell zu erweitern und für Infektionen des ZNS zu nutzen. Der Infektionsweg und die bevorzugte Lokalisation der Viren im ZNS wurden aufgespürt. Diese Ergebnisse können zusammen mit der permanent MHV-68-positiven B-Zelllinie genutzt werden, die pathogenetische Wirkung des Virus auf Zellen und Strukturen des ZNS weiter zu untersuchen.

7 Literatur

- Blasdell K, Mc Cracken C, Morris A, Nash AA, Begon M, Bennet M & Steward JP** (2003): The wood mouse is a natural host for Murid herpesvirus 4. *Journal of Gen. Virol.* 84: 111-113
- Blaskovic D, Stancekova M, Svoboda J & Mistrikova J** (1980): Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta virologica* 24: 468
- Blaskovic D, Stanekova D & Rajcani J** (1984): Experimental pathogenesis of murine herpesvirus in newborn mice. *Acta Virologica* 28: 225-231
- Bowden RJ, Simas JP, Davis AJ & Efstathiou S** (1997): Murine gammaherpesvirus 68 encodes tRNA-like sequences which are expressed during latency. *Journal of Gen. Virol.* 78: 1675-1687
- Dutia BM, Allen DJ, Dyson H & Nash AA** (1999c): Type I interferons and IRF-1 play a critical role in the control of a gammaherpesvirus infection. *Virology* 261: 173-179
- Dutia BM, Steward JP, Clayton RAE, Dyson H & Nash AA** (1999a): Kinetic and phenotypic changes in murine lymphocytes infected with murine gammaherpesvirus-68 in vitro. *Journal of Gen. Virol.* 80: 2729-2736
- Efstathiou S, Ho YM, Hall S, Styles CJ, Scott SD & Gompels VA** (1990): Murine herpesvirus 68 is genetically related to the γ -herpesviruses EBV + HVS. *Journal of Gen. Virology* 71: 1365-1372
- Ehtisham S, Sunil-Chandra NP & Nash AA** (1993): Pathogenesis in mice deficient in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Journal of Virology* 67: 5247-5252
- Flaño E, Husain SM, Sample JT, Woodland DL & Blackman MA** (2000): Latent murine γ -herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells and macrophages. *Journal of Immunology* 165: 1074-1081

- Flaño E, Kim IJ, Moore J, Woodland DL & Blackman MA** (2003): Differential γ -herpesvirus distribution in distinct anatomical locations and cell subsets during persistent infection in mice. *Journal of Immunology* 170: 3828-3834
- Häusler M, Ramaekers VT, Doenges M, Schweizer K, Ritter K & Schaade L** (2002): Neurological Complications of Acute and Persistent Epstein-Barr Virus Infection in Paediatric Patients. *Journal of Med. Virology* 68: 253-263
- Husain SM, Usherwood EJ, Dyson H, Coleclough C, Coppola MA, Woodland DL, Blackman MA, Stewart JP & Sample JT** (1999): Murine gammaherpesvirus M2 gene is latency-associated and its protein a target for CD8⁺ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7508-7513
- Jensen KK, Chen SC, Hipkin RW, Wiekowski MT, Schwarz MA, Chou CC, Simas JP, Alcamí A & Lira SA** (2003): Disruption of CCL 21-induced chemotaxis in vitro and in vivo by M 3, a chemokine-binding protein encoded by murine gammaherpesvirus 68. *Journal of Virology* 77: 624-630
- Macrae AI, Dutia BM, Milligan S, Allen DJ, Mistrikova J, Davison AJ, Nash AA & Stewart JP** (2001): Analysis of a novel strain of murine gammaherpesvirus reveals a genomic locus important for acute pathogenesis. *Journal of Virology* 75: 5315-5327
- Martinez-Guzman DA, Rickabough T, Wu TT, Brown H, Cole S, Song MJ, Tong L & Sun R** (2003): Transcription program of murine gammaherpesvirus 68. *Journal of Virology* 77: 10488-10503
- Nash AA, Dutia BM, Stewart JP & Davison AJ** (2001): Natural history of murine γ -herpesvirus infection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356: 569-579
- Neyts J & De Clercq E** (1998): In vitro and in vivo inhibition of murine gamma herpesvirus 68 replication by selected antiviral agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 42: 170-172

Peacock JW & Bost KL (2000): Infection of intestinal epithelial cells and development of systemic disease following gastric instillation of murine gammaherpesvirus -68. *Journal of Gen. Virol.* 81: 421-429

Rajcani J, Blaskovic D, Svoboda J, Ciampor F, Huckova D & Stanekova D (1985): Pathogenesis of acute and persistent murine herpesvirus infection in mice. *Acta Virol.* 29: 51-60

Rajcani J, Bustamante de Contreras LR & Svoboda J (1986): Corneal inoculation of murine herpesvirus in mice: the absence of neural spread. *Acta Virol.* 31: 25-30

Rochford R, Lutzke ML, Alfinito RS, Clavo A & Cardin RD (2001): Kinetics of murine gammaherpesvirus 68 gene expression following infection of murine cells in culture and in mice. *Journal of Virology* 75: 4955-4963

Sangster MY, Topham DJ, D'Costa S, Cardin RD, Marion TN, Myers K & Doherty PC (2000): Analysis of the virus-specific and nonspecific B cell response to a persistent B-lymphotropic gammaherpesvirus. *Journal of Immunology* 164: 1820-1828

Simas JP, Swann D, Bowden R & Efstathiou S (1999): Analysis of murine gammaherpesvirus-68 transcription during lytic and latent infection. *Journal of Gen. Virol.* 80: 75-82

Stevenson PG & Doherty PC (1998): Kinetic analysis of the specific host response to a murine gammaherpesvirus. *Journal of Virology* 72: 943-949

Stevenson PG, Cardin RD, Christensen JP & Doherty PC (1999): Immunological control of a murine gammaherpesvirus independent of CD8⁺ T cells. *Journal of Gen. Virol.* 80: 477-483

- Steward JP, Usherwood EJ, Ross A, Dyson H & Nash AA** (1998): Lung epithelial cells are a major site of murine gammaherpesvirus persistence. *Journal of Exp. Med.* 187: 1941-1951
- Sunil-Chandra NP, Arno J, Fazakerley J & Nash AA** (1994): Lymphoproliferative disease in mice infected with murine gammaherpesvirus 68. *Am. Journal of Pathology* 145: 818-826
- Sunil-Chandra NP, Efstathiou S & Nash AA** (1993): Interactions of murine gammaherpesvirus 68 with B and T cell lines. *Virology* 193: 825-833
- Sunil-Chandra NP, Efstathiou S, Arno J & Nash AA** (1992): Virological and pathological features of mice infected with murine gammaherpesvirus 68. *Journal of Gen. Virol.* 73: 2347-2356
- Terry LA, Steward JP, Nash AA & Fazakerley JK** (2000): Murine gammaherpesvirus-68 infection of and persistence in the central nervous system. *Journal of Gen. Virol.* 81: 2635-2643
- Usherwood EJ, Ross AJ, Allen AJ & Nash AA** (1996b): Murine gammaherpesvirus-induced splenomegaly: a critical role for CD4⁺ T cells. *Journal of Gen. Virol.* 77: 627-630
- Usherwood EJ, Steward JP, Robertson K, Allen DJ & Nash AA** (1996a): Absence of splenic latency in murine gammaherpesvirus 68-infected B cell-deficient mice. *Journal of Gen. Virol.* 77: 2819-2825
- Virgin HW, Latreille P, Wamsley P, Hallsworth K, Weck KE, Dal Canto AJ & Speck SH** (1997): Complete sequence and genomic analysis of gammaherpesvirus 68. *Journal of Virology* 71: 5894-5904
- Virgin HW, Presti RM, Xi-Yang L, Liu C & Speck SH** (1999): Three distinct regions of the murine gammaherpesvirus 68 genome are transcriptionally active in latently infected mice. *Journal of Virology* 73: 2321-2332

A Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BHK-21	Baby Hamster Kidney
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
CD	cluster of differentiation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
EBV	Epstein-Barr Virus
E. coli	Escherichia coli
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GÄ	Genomäquivalent
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
IFT	Immunfluoreszenztest
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LMU	Ludwig Maximilians Universität
MHV-68	murines Herpesvirus 68
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	Stichprobengröße
NEA	non essential aminoacid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rotations per minute
RT	Reverse Transkriptase
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA

Abbildungsverzeichnis

Abb. I	pGlow-TOPO Vektor (der entsprechenden Gebrauchsanweisung der Firma Invitrogen entnommen)	8
Abb. 1	Real-Time-PCR Schmelzkurve des G 50 Gens	31
Abb. 2	Produkte der Real-Time-PCR nach Trennung mittels Gelelektrophorese	31
Abb. 3	M 3 nested PCR mit spezifischen Banden bei 133 bp	32
Abb. 4	BHK-21 Zellen inkubiert mit MHV-68-positivem Serum 1:1024	33
Abb. 5	BHK-21 Zellen inkubiert mit negativem Mausserum 1:50	33
Abb. 6	Nachweis von muriner GAPDH (236 bp)	34
Abb. 7	Nachweis von G 50 Gen in B-Zelllinie (293 bp)	34
Abb. 8	MHV-68 positive Lymphozytenkultur inkubiert mit PBS	35
Abb. 9	MHV-68 positive Lymphozytenkultur inkubiert mit MHV-68 Antikörper 1:64	35
	Die Abbildungen 8 und 9 wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau S. Kuropka; Doktorandin am Institut für medizinische Mikrobiologie der RWTH-Aachen	
Grafik I	Virusmenge nach Infektion am 1. oder 5. Lebenstag	36
Grafik II	Infektionsraten einzelner Organe bezogen auf erfolgreich infizierte Tiere	37
Grafik III	Direkter Vergleich der Virusmengen in Blut und Milz	38
Grafik IV	Direkter Vergleich der Virusmengen in Blut und Leber	38
Abb. 10	Maus 2/3-18 im Vergleich mit gleichalten Kontrolltieren	39
Grafik V	Verlauf der Virusmengen. Zeitpunkt der Infektion: 1.-6. Lebenstag	40
Abb. 11a	MHV-68-positive Hepatozyten perivaskulär	42
Abb. 11b	Leberbefund eines nicht infizierten Tieres	42
Abb. 12a	MHV-68-positive Nierentubuli	42
Abb. 12b	Nierenbefund eines Kontrolltieres	42
Abb. 13a	Peribronchiolärer Nachweis von MHV-68	42
Abb. 13b	Lunge eines Kontrolltieres	42
Grafik VI	Vergleich Virusmengen Milz/ Großhirn	44
Grafik VII	Vergleich Virusmengen Großhirn	44
Abb. 14	Tier 2/3-18 Plexus choroideus	46

Abb. 15	Tier 3/2-4 Großhirnrinde	46
Abb. 16	Tier 3/4-6 Kleinhirn	46
Abb. 17	Tier 3/3-12 Ammonshorn	46
Grafik VIII	Viruslasten vs Entzündungsreaktion	47
Abb. 18a	Tier 3/4-6 Temporallappen CD-45 Färbung	47
Abb. 18b	Tier 3/4-6 Temporallappen MHV-68-IFT	47
Abb. 19a	Tier 3/4-6 Temporalregion CD-45 Färbung	48
Abb. 19b	Tier 3/4-6 IFT gleiche Region	48
Abb. 20a	Tier 3/4-6 Herzmuskel mit MHV-68 Nachweis	48
Abb. 20b	Tier 3/4-6 Herzmuskelnekrose	48
Abb. 21a	Perivaskuläre Infiltrate in der Leber	48
Abb. 21b	Perivaskulär infizierte Hepatozyten im IFT	48

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Ritter für die Ermöglichung dieser Arbeit, für wesentliche Anregungen sowohl bei der praktischen Durchführung, als auch bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. M. Häusler danke ich für die Aufnahme in das Projekt und dafür, dass er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Dr. S. Scheithauer und Herrn Dr. M. Kleines danke ich für die gute Zusammenarbeit und Betreuung.

Ganz besonders danke ich Michele Peters und Kirsten Schellenberg, ohne deren Hilfe ich den praktischen Teil der Arbeit sicher nicht beendet hätte. Außerdem natürlich für die Kaffeepausen.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Doktoranden und Diplomanden am Institut bzw. im MHV-Projekt für die gute Zusammenarbeit.

Evelyn danke ich für die Gewebeschnitte, ihre Gastfreundschaft und die schönsten Feiern in Aachen.

Claudia danke ich dafür, dass sie mich beim Schreiben dieser Arbeit unterstützt hat, und dafür, dass sie eine tolle Mutter ist.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester. Dafür, dass es sie gibt, und dafür, dass ich das werden konnte, was ich heute bin.

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten
im Institut für Medizinische Mikrobiologie/ Virologie des Universitätsklinikums Aachen
hinterlegt sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Matthias Engler
Geboren am: 06.06.1975 in Frankfurt am Main

Schul Ausbildung

1981 – 1985 Heiligenstockschule Hofheim am Taunus, Grundschule
1985 – 1991 Elisabethenschule Hofheim,
staatlich anerkannte private Realschule
1991 – 1994 Main-Taunus-Schule Hofheim,
Gymnasiale Oberstufe
Abgeschlossen mit der allgemeinen Hochschulreife am
10.06.1994

Zivildienst/ Berufsausbildung

Aug. 1994 – Okt. 1995 Zivildienst in Altenpflegeeinrichtung der Caritas in Hofheim
Okt. 1995 – März 1996 Studium der Geschichte, Politologie und Philosophie an
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am
Main
Okt. 1996 – Sep. 1999 Ausbildung zum Krankenpfleger an den Kliniken des Main-
Taunus-Kreises in Hofheim / Bad Soden

Studium

Okt. 1999 – Sep. 2004 Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule in Aachen
Okt. 2004 – März 2006 Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der
Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
03.05. 2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

Seit 01.06.2006 Assistenzarzt an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
des Klinikums Offenbach